

Université de Montréal

# **Caractérisation des interactions établies par la région riche en prolines de la ligase de l'ubiquitine Itch**

par

Guillaume Desrochers

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D.)  
en sciences biologiques

Décembre, 2015

© Guillaume Desrochers, 2015

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Caractérisation des interactions établies par la région riche en prolines de la ligase de  
l'ubiquitine Itch

présentée par : Guillaume Desrochers

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Christopher Cameron, président-rapporteur

Annie Angers, directrice de recherche

David Morse, membre du jury

Jean-François Trempe, examinateur externe

Hélène Lebel, représentante de la doyenne de la FES

## Résumé

Itch est un membre de la famille des ligases de l'ubiquitine de type CWH (C2-WW-HECT) impliqué dans le contrôle de la signalisation inflammatoire, des facteurs de transcription et le tri des récepteurs membranaires. La fonction d'Itch implique généralement sa capacité à induire la dégradation de ses substrats. Pour accomplir cette fonction, Itch doit d'abord interagir avec ses cibles. Itch possède quatre domaines WW lui permettant d'accomplir la majorité de ses fonctions. En plus de ces domaines, Itch possède une PRR (région riche en prolines) unique parmi les ligases CWH. Cette région est bien conservée chez les vertébrés, ce qui suggère son importance. Cette région permet à Itch d'interagir avec des protéines contenant un domaine SH3 (Src homology 3). Plusieurs partenaires SH3 furent identifiés, cependant l'on connaît peu de choses concernant la fonction et l'établissement de ces complexes. Dans ce projet, nous avons analysé les propriétés de liaison d'un sous-groupe de protéines à domaine SH3 impliquées dans l'endocytose et la signalisation cellulaire. Nos travaux ont permis d'identifier de nouveaux partenaires et aussi de déterminer que différents domaines SH3 ciblent la même région riche en prolines, mais impliquent des résidus distincts. Ces résultats démontrent la variété des propriétés de liaison démontrées par la PRR d'Itch et sa préférence marquée pour l'Endophiline. Parmi les partenaires identifiés, Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) est particulièrement intéressant en raison de son rôle crucial dans la signalisation cellulaire. Nous avons démontré ici qu'Itch ubiquityle Grb2, mais ne cause pas sa dégradation, contrairement à l'Endophiline. Nos travaux démontrent que la PRR d'Itch est versatile quant à ses interactions et leurs conséquences.

**Mots-clés :** Ligase de l'ubiquitine, Itch, région riche en prolines, SH3, Endophiline, Pacsine, Amphiphysine, Grb2,  $\beta$ -PIX, endocytose.

## Abstract

Itch is a member of the CWH (C2-WW-HECT) family of ubiquitin ligases involved in the control of inflammatory signalling pathways, several transcription factors, and sorting of surface receptors. Itch functions generally involve ubiquitylation-induced degradation of its substrates. To accomplish such function, Itch must first interact with its target. Itch possesses four well-characterized WW domains mediating most of its known interactions. In addition to these binding modules, Itch also has a unique proline-rich region (PRR) among other CWH ligases. This sequence is well conserved among vertebrates, underlying its importance. The PRR of Itch enables its interaction with SH3 (Src homology 3) domain-containing proteins. Several proteins have been found to interact with the PRR of Itch. However, little is known about the function of these complexes and how they are established. Here, we have analyzed the binding properties of a subset of SH3 domain-containing proteins involved in endocytosis and cellular signalling. We have characterized novel SH3-PRR interactions established by Itch and found that various SH3 domains can target the same proline-rich sequence with the implication of distinct residues. These results demonstrate the variety of binding properties exhibited by the PRR of Itch and its clear preference for Endophilin. Among its binding partners, Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) is of paramount interest given its major implications in cell signalling. We have thus demonstrated that Grb2 is ubiquitylated by Itch and that, in contrast with Endophilin, this reaction is not associated with proteolytic functions. Itch PRR is thus a versatile binding module and the interactions established by this region can mediate distinct fates.

**Keywords** : Ubiquitin ligase, Itch, proline-rich region, SH3, Endophilin, Pacsin, Amphiphysin, Grb2,  $\beta$ -PIX, endocytosis.



# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiii
1. Introduction.....	15
1.1. La réaction d'ubiquitylation.....	16
1.2. Les ligases de la famille CWH.....	18
1.3. Principales fonctions des ligases CWH .....	19
1.4. Architecture de la famille CWH .....	21
1.4.1. Domaine C2 .....	21
1.4.2. Domaines WW.....	21
1.4.3. Domaine HECT .....	22
1.5. Région riche en prolines .....	23
1.6. Les domaines SH3 .....	23
1.7. Protéines interagissant avec la ligase Itch.....	25
1.7.1. Endophiline et CIN85 .....	27
1.7.2. $\beta$ -PIX.....	32
1.7.3. SNX 9 et 18.....	34
1.7.4. STAM-1 .....	36
1.8. Protéines de l'endocytose possédant un PRR permettant le recrutement de différentes protéines à domaine SH3 .....	38
1.8.1. Synaptojanine.....	38
1.8.2. Dynamine.....	41
1.9. Redondance des interactions SH3-PRR.....	43

1.10.	Sélection du sous-groupe de protéines à l'étude.....	45
1.10.1.	L'amphiphysine .....	46
1.10.2.	L'Intersectine .....	48
1.10.3.	Pacsine .....	51
1.10.4.	Grb2 .....	53
1.11.	Projet de recherche.....	55
2.	Chapitre 2.....	60
Liaison de multiples domaines SH3 à la région riche en prolines conservée de la ligase Itch.		60
2.1.	Mise en contexte .....	61
2.2.	Abstract.....	64
2.3.	Introduction.....	64
2.4.	Experimental procedures .....	67
2.4.1.	Cell culture and transfection .....	67
2.4.2.	Plasmids .....	67
2.4.3.	Antibodies.....	68
2.4.4.	BRET experiments.....	68
2.4.5.	Pull-down experiments .....	70
2.4.6.	Western blot and Far Western analysis.....	70
2.4.7.	Expression and purification of proteins .....	71
2.4.8.	Isothermal titration calorimetry studies .....	72
2.4.9.	Competition assays .....	72
2.5.	Results.....	73
2.5.1.	Itch interacts with endocytic SH3 domain-containing proteins <i>in vivo</i> .....	73
2.5.2.	Closely related ubiquitin ligases do not recognize the endophilin SH3 domain .	74
2.5.3.	Itch binds SH3 domain-containing proteins directly through its PRR .....	74
2.5.4.	The affinity of the Itch PRR for different SH3 domains varies greatly.....	76
2.5.5.	The Itch PRR binds a single SH3 domain at a time.....	77
2.5.6.	Endophilin and $\beta$ -PIX compete for Itch PRR binding.....	77
2.5.7.	Ubiquitylation of SH3 domain-containing proteins by Itch .....	78
2.6.	Discussion.....	80

2.6.1.	Itch interacts with multiple SH3 domain proteins .....	80
2.6.2.	The Itch PRR displays variable affinity for different SH3 domains.....	81
2.6.3.	The Itch PRR binds a single SH3 domain at the time.....	82
2.6.4.	Itch ubiquitylates proteins binding to its PRR domain .....	84
2.6.5.	Conclusion .....	85
2.7.	Figures.....	87
3.	Chapitre 3.....	98
	Mécanismes moléculaires permettant la liaison de domaines SH3 à la région riche en prolines de la ligase Itch .....	98
3.1.	Mise en contexte .....	99
3.2.	Abstract .....	102
3.3.	Introduction.....	103
3.4.	Experimental procedures .....	105
3.4.1.	Cell culture and transfection .....	105
3.4.2.	Plasmids .....	105
3.4.3.	Antibodies .....	106
3.4.4.	Pull-down experiments .....	106
3.4.5.	Western blot analysis .....	107
3.4.6.	Expression and purification of proteins .....	107
3.4.7.	Isothermal titration calorimetry studies .....	108
3.4.8.	Mass spectrometry .....	108
3.4.9.	Crystallography.....	109
3.4.10.	Modelling.....	109
3.5.	Results.....	110
3.5.1.	SH3 domain-containing proteins binding to Itch PRR .....	110
3.5.2.	Molecular dissection of Itch PRR-mediated interactions .....	111
3.5.3.	Residues located outside the proline-rich core do not contribute to the binding of SH3 domain-containing proteins .....	114
3.5.4.	Crystal structure of the super SH3 complex formed between $\beta$ -PIX and Itch PRR.....	114

3.5.5. Modelling of Itch PRR interaction with SH3 domains.....	116
3.6. Discussion.....	116
3.7. Figures.....	121
4. Chapitre 4.....	132
Ubiquitylation de la protéine Grb2 par la ligase de l'ubiquitine Itch .....	132
4.1. Mise en contexte .....	133
4.2. Abstract.....	136
4.3. Introduction.....	137
4.4. Experimental procedures .....	138
4.4.1. Cell culture, transfection and treatments .....	138
4.4.2. Plasmids .....	139
4.4.3. Antibodies.....	139
4.4.4. BRET experiments.....	140
4.4.5. Pull-down experiments .....	141
4.4.6. Western blot.....	142
4.4.7. Large-scale expression and purification of proteins .....	142
4.4.8. Isothermal titration calorimetry studies .....	143
4.4.9. Ubiquitin linkage screening .....	143
4.4.10. Modelling.....	143
4.5. Results.....	144
4.5.1. Grb2 interacts with Itch PRR.....	144
4.5.2. Both SH3 domains of Grb2 are required for binding to Itch .....	145
4.5.3. Itch interacts directly with Grb2 .....	145
4.5.4. Identification of sequences within Itch PRR that are targeted by Grb2 SH3 domains.....	146
4.5.5. Itch ubiquitylates Grb2 .....	147
4.6. Discussion.....	149
4.7. Figures.....	154
5. Discussion.....	162
5.1. La PRR d'Itch lui permet lier spécifiquement différentes protéines à domaine SH3.....	163

5.2.	Les complexes formés avec la PRR d'Itch présentent différentes stoechiométries..	164
5.3.	L'affinité de la PRR d'Itch envers différents domaines SH3 varie grandement .....	166
5.4.	Préférences de liaisons des domaines SH3 envers la PRR d'Itch.....	168
5.5.	Structure et modélisation des interactions SH3-PRR .....	169
5.6.	Itch ubiquityle la majorité des protéines à domaine SH3 interagissant avec sa PRR	173
5.7.	Analyse par spectrométrie de masse des protéines à domaine SH3 liant la PRR d'Itch. .....	175
6.	Conclusion et perspectives.....	177
	Bibliographie.....	179

## Liste des tableaux

Tableau 1-1. Protéines interagissant avec la ligase Itch .....	26
Table 2-1. Primers used for amplification of subcloned sequences.....	96
Table 2-S1. PXXP motifs found in Itch, WWP1, WWP2 and Nedd4.....	97
Table 3-1. SH3 domain-containing proteins interacting with Itch PRR identified by mass spectrometry.....	130
Table 3-2. Data collection and refinement statistics.....	131

## Liste des figures

Figure 1-1. Machinerie nécessaire à la réaction d'ubiquitylation .....	16
Figure 1-2. Différents types d'ubiquitylation et leurs fonctions cellulaires .....	17
Figure 1-3. Cladogramme des séquences humaines codant les différentes ligases de la famille CWH ainsi que leur organisation structurale .....	19
Figure 1-4. Organisation modulaire de la ligase de l'ubiquitine Itch. ....	23
Figure 1-5. Différentes représentations du domaine SH3 montrant la liaison de la PRR . ....	27
Figure 1-6. Modèle de l'internalisation du récepteur de l'EGF .....	28
Figure 1-7. Structure du complexe formé entre le domaine SH3 de $\beta$ -PIX et la région riche en proline d'Itch .....	32
Figure 1-8. Implication des complexes ESCRT dans le transfert des récepteurs des MVBs vers le domaine intraluminaire de ces vésicules .....	36
Figure 1-9. Schématisation des principales étapes de l'endocytose dépendante de la clathrine .....	41
Figure 1-10. Arbre phylogénique des protéines à domaine BAR/F-BAR .....	44
Figure 1-11. Rôles des protéines à domaine BAR dans l'endocytose dépendante de la clathrine .....	45
Figure 1-12. Signalisation induite par les RTKs impliquant Grb2. ....	55
Figure 2-1. Itch interacts with selected SH3 domain-containing proteins <i>in vivo</i> . ....	87
Figure 2-2. SH3 domain-containing proteins interact specifically with the Itch PRR. ....	88
Figure 2-3. Direct binding of the Itch PRR to SH3 domain-containing proteins. ....	90
Figure 2-4. ITC analysis of the Itch-PRR peptide (residues 224–276) binding to different SH3 domains. ....	92
Figure 2-5. Itch PRR cannot accommodate two SH3 domains simultaneously. ....	93
Figure 2-6. Itch ubiquitylates Endophilin, Amphiphysin, and Pacsin. ....	95
Figure 3-1. Representation of a typical SH3 domain interacting with canonical class I and II peptides. ....	122
Figure 3-2. Binding preferences of the SH3 domains of Amphiphysin, Pacsin, Endophilin and $\beta$ -PIX towards the PRR of Itch. ....	124

Figure 3-3. Representative ITC thermograms obtained by successive addition of Itch PRR to a subset of SH3 domains. ....	126
Figure 3-4. Crystal structure of the super SH3 interaction between the PRR of Itch and two $\beta$ -PIX SH3 domains. ....	128
Figure 3-5. Modelling of the interactions mediated by Itch PRR towards additional SH3 domains. ....	129
Figure 4-1. Itch PRR binds to Grb2 SH3. ....	155
Figure 4-2. ITC analysis of the Itch PRR-Grb2 interaction. ....	157
Figure 4-3. Grb2 preferred binding motif within Itch PRR. ....	158
Figure 4-4. Non-degradative ubiquitylation of Grb2 by the ligase Itch. ....	160
Figure 4-5. Modelling of the super SH3 complex formed between Itch PRR and Grb2 SH3s. ....	161



## Liste des abréviations

ACK2	: Activated Cdc42-Associated Kinase-2
AMSH	: Associated Molecule with the SH3 Domain of STAM
Arp2/3	: Actin Related Protein 2/3
Atg9	: Autophagy related gene 9
β-PIX	: PAK-Interacting Exchange Factor Beta
BRET	: Bioluminescence Resonance Energy Transfer
Cbl	: Casitas B-Lineage Lymphoma
CC	: Coiled-coil
Cdc42	: Cell Division Control Protein 42
CIN85	: Cbl-Interacting Protein of 85 kDa
CLAP	: Clathrin/AP-2-Binding
CPG2	: Candidate plasticity gene 2
CWH	: C2-WW-HECT
EGF	: Epidermal Growth Factor
EH	: Eps15 Homology
ESCRT	: Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
FEME	: Fast Endophilin-mediated endocytosis
FISH	: Five SH3 Domain-Containing Protein
Gab	: Grb2-Associated Protein
GED	: GTPase Effector Domain
GEF	: Guanine Exchange Factor
Grb2	: Growth factor receptor-bound protein 2
HGF	: Hepatocyte Growth Factor
Hrs	: Hepatocyte Growth Factor-Regulated Tyrosine Kinase Substrate
ITC	: Isothermal Titration Calorimetry
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MVB	: Multivesicular Bodies
PAK	: p21-Activated Kinase
PH	: Pleckstrin Homology

PI3K	: Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	: Phosphatidylinositol-3-Monophosphate
PP2	: Polyproline-2
PRR	: Proline-Rich Region
PX	: Phox
RCPG	: Récepteurs couplés aux protéines G
RTK	: Récepteurs Tyrosine Kinase
Sac1	: Suppressor of Actin 1
SH3	: Src homology 3
SNAP-25	: Synaptosomal-Associated Protein 25
SNX	: Sorting Nexin
Sos	: Son-of-Sevenless
STAM-1	: Signal Transducing Adapter Molecule 1
TIEG	: TGF- $\beta$ -Inducible Early Gene 1
Ubl	: Ubiquitin-like
UIM	: Ubiquitin-Interacting Motif
USP8	: Ubiquitin-specific protease 8
UVRAG	: Ultraviolet irradiation resistant-associated gene
WASP	: Wiskott–Aldrich Syndrome protein

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice, Annie Angers, pour m'avoir permis de vivre cette expérience incroyable. Merci pour ton esprit critique, tes idées, ton support inconditionnel, ton ouverture d'esprit, ta disponibilité et ta patience. Il est rare de rencontrer une personne aussi exceptionnelle de qui l'on pourrait sans cesse apprendre.

Je remercie mes collègues passés; Bilal Azakir, Raymond Wong et Rachel Forget et Logan Schwartz. Sans votre aide et votre support, ce projet n'aurait jamais pu être réalisé. Merci aussi à la nouvelle équipe formée de Malik Gueye, Riham Ayoubi et Keivan Farzaneh. Merci à tous les stagiaires ayant participé à ce projet de même qu'à mes collègues du département avec qui j'ai partagé tant de bons moments: Maxime Lemieux, Alexe Vigneault-Pinard, Syndia Champagne, Ha-Loan Phan, Abdellatif Nemri, Narcis Ghisovan et Serguei Marshanski.

Je remercie Dr Omichinski du département de biochimie sans qui ce projet n'aurait pu être réalisable. Merci de m'avoir accueilli si chaleureusement dans votre laboratoire. Merci aussi pour votre support et vos conseils judicieux tout au long de ce projet. Merci à tous les membres de son laboratoire pour m'avoir si chaleureusement accueilli. J'ai vraiment adoré travailler avec vous. Je tiens à remercier spécialement Mathieu Lussier-Price pour son aide précieuse dans la purification de protéines et l'ITC. Merci aussi à Laurent Cappadocia pour la portion cristallographie de ce projet.

Merci aussi au Dr Bouvier de m'avoir permis de réaliser les expériences de BRET de même qu'aux membres de son laboratoire pour m'avoir si chaleureusement accueilli. Merci

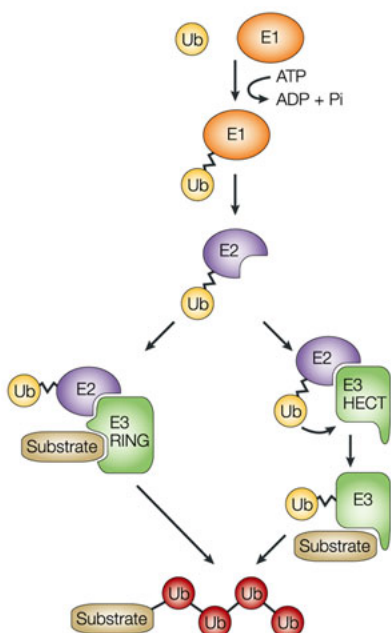
particulièrement à Elena Shirokova pour son aide lors du clonage d'Itch et à Billy Breton pour ses nombreux conseils sur le BRET et son support technique indispensable.

Finalement, je tiens à remercier mes parents et mon frère pour leur soutien inconditionnel tout au long de mes études. Merci aussi à ma douce Caroline pour m'avoir accompagné dans toute cette aventure.

# 1. Introduction

Cette thèse porte sur la ligase de l'ubiquitine Itch appartenant à la famille CWH (C2-WW-HECT). Itch est impliquée dans plusieurs processus cellulaires importants notamment au sein des voies de signalisations inflammatoires, de l'endocytose de récepteurs membranaires et du contrôle de certains facteurs de transcription. Ces rôles impliquent généralement la capacité d'Itch à ubiquityler ses substrats afin d'induire leur dégradation. Afin d'accomplir ses fonctions, Itch doit d'abord être en mesure d'interagir avec ses différents partenaires. La majorité des fonctions attribuées à la ligase implique des interactions établies via ses domaines WW. Itch possède quatre domaines de ce type lui permettant d'interagir avec de courts motifs PPxY. Parmi les ligases de la famille CWH, Itch est la seule qui possède, en plus des domaines communs, une PRR (Proline-Rich Region) bien conservée chez les vertébrés. Cette région lui permet d'interagir avec différentes protéines contenant un domaine SH3 faisant partie de larges complexes formés lors de l'endocytose et la signalisation cellulaire (1). Contrairement à l'abondance des recherches portant sur les interactions établies par les domaines WW d'Itch, peu de travaux portent sur la liaison à sa PRR. Dans le but de mieux comprendre le rôle joué par cette région, nous avons sélectionné un sous-groupe formé de ces différentes protéines à domaine SH3 (Src homology 3) afin d'évaluer leur liaison avec Itch. Nous avons aussi caractérisé ces interactions à l'aide de différentes techniques afin d'en déterminer les bases moléculaires. Étant donné l'activité ligase de la protéine Itch, nous avons finalement évalué sa capacité à ubiquityler ces différents partenaires.

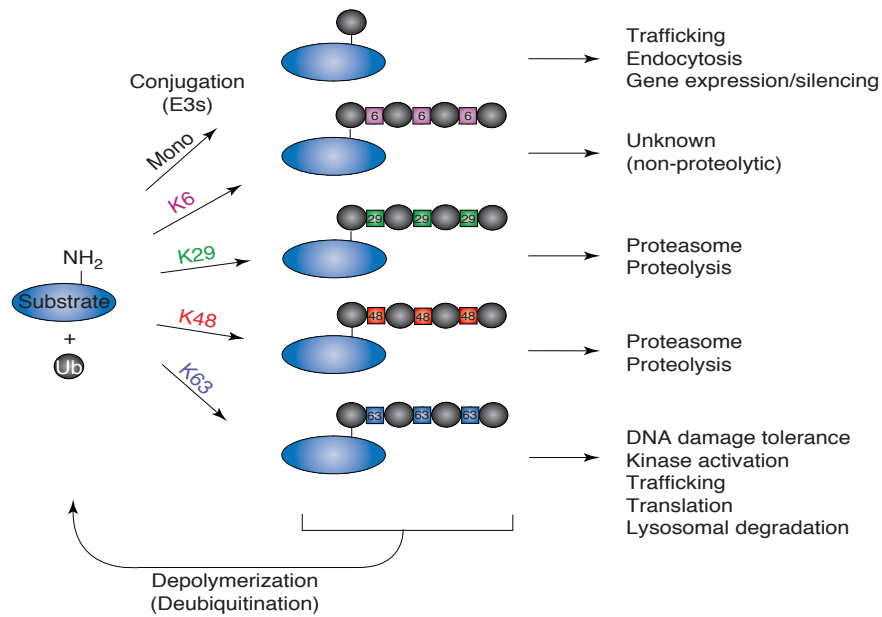
## 1.1. La réaction d'ubiquitylation



**Figure 1-1. Machinerie nécessaire à la réaction d'ubiquitylation (2).**

L'ajout d'une molécule d'ubiquitine requiert la participation d'un trio protéique ayant des fonctions qui se complètent. Il existe deux types de ligases de l'ubiquitine soit les HECT et les RING. Ces classes sont définies par la formation ou non d'un intermédiaire avec l'ubiquitine précédant son transfert au substrat (2).

L'ubiquitylation consiste en l'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur un substrat. Cette étiquette est composée de 76 acides aminés et est ajoutée via la liaison covalente de ses glycines terminales sur un résidu lysine du substrat. Cette réaction nécessite la participation de 3 protéines distinctes (Figure 1-1). L'enzyme E1 permet d'abord l'activation de l'ubiquitine, puis l'enzyme E2 se charge de son transport vers la E3 qui catalyse son transfert sur le substrat. Les enzymes E3, ou ligases de l'ubiquitine, sont une classe d'enzymes diversifiée qui



**Figure 1-2. Différents types d'ubiquitylation et leurs fonctions cellulaires (3).**

L'ajout d'une molécule d'ubiquitine peut se faire de façon simple, sur une ou plusieurs lysines du substrat. On peut aussi observer la polyubiquitylation qui implique la formation d'une chaîne d'ubiquitines sur le substrat. L'ubiquitine étant elle-même une protéine contenant 7 résidus lysines, elle contient en effet des sites sur lesquels d'autres ubiquitines peuvent être ajoutées. Bien qu'il existe des chaînes mixtes faisant intervenir simultanément différents types d'embranchements, la position de la lysine de la première ubiquitine sur laquelle est ajoutée la seconde molécule dicte de façon générale la façon dont seront ajoutées les ubiquitines subséquentes afin de former une chaîne. Au niveau cellulaire, ces différents types d'ubiquitylation permettent d'accomplir des fonctions variées (3).

interagissent directement avec le substrat à ubiquityler en plus de recruter le transporteur E2. Les ligases sont ainsi responsables de la spécificité de la réaction d'ubiquitylation (3). Cette modification peut prendre différentes formes et avoir des impacts cellulaires distincts. Ainsi,

on distingue la monoubiquitylation de la polyubiquitylation qui implique la formation de chaînes d'ubiquitine en liant ces molécules entre elles. L'ubiquitine possède 7 lysines sur lesquelles une autre molécule d'ubiquitine peut être ajoutée, permettant la formation d'autant de types de chaînes (Figure 1-2). Parmi elles, les chaînes K29, K48 sont particulièrement associées à la dégradation protéasomale du substrat alors que la monoubiquitylation est généralement associée à son impact sur l'endocytose et le trafic intracellulaire des protéines. La formation de chaînes d'ubiquitine K63 est pour sa part impliquée dans différents processus tels que la réparation des dommages causés à l'ADN et la traduction. Cette forme d'ubiquitylation peut aussi, de façon similaire à la monoubiquitylation, affecter le trafic intracellulaire et même entraîner la dégradation lysosomale des substrats ainsi ciblés (3,4).

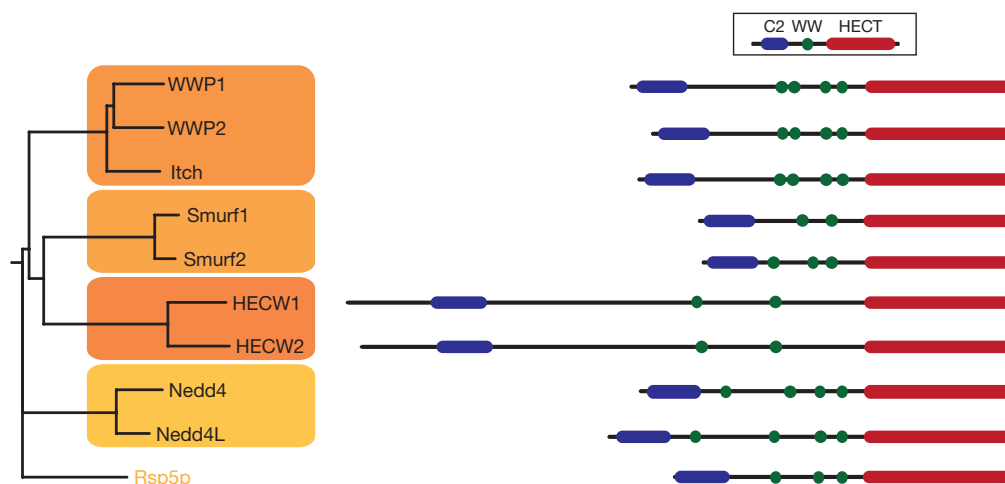
Il existe deux grandes classes d'enzymes E3 catalysant toutes deux le transfert de l'ubiquitine de la E2 vers le substrat. Les ligases de type RING (Really Interesting New Gene) se distinguent de leurs homologues par l'absence de formation d'un complexe intermédiaire entre l'ubiquitine et la ligase lors de la réaction d'ubiquitylation. Les enzymes de type HECT (Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus) vont quant à elles former un lien thioester transitoire avec la molécule d'ubiquitine avant son transfert au substrat (5). Il existe 28 ligases différentes appartenant à ce groupe chez l'humain permettant la régulation d'une multitude de processus cellulaires. L'impact de ces ligases découle généralement de leur capacité à ubiquityler ces substrats afin d'induire leur dégradation protéasomale ou lysosomale (6-8).

## **1.2. Les ligases de la famille CWH**

Parmi les ligases de type HECT, on retrouve un groupe monophylétique d'enzymes CWH dont le nom reflète leur architecture commune composée d'une succession de ces domaines protéiques. Il existe 9 membres différents appartenant à cette famille chez l'humain



(Figure 1-3). Bien que ces ligases démontrent une organisation similaire, ces enzymes possèdent tout de même un certain degré de spécialisation.



**Figure 1-3. Cladogramme des séquences humaines codant les différentes ligases de la famille CWH ainsi que leur organisation structurale (9).**

L'homologue Rsp5p chez la levure *S. cerevisiae* est représenté pour fin de comparaison. Les boîtes oranges regroupent les gènes ayant divergés de l'un des quatre gènes ancestraux lors de l'émergence des métazoaires, tel que proposé par Marin (10). L'alignement est basé sur les séquences codantes générées à l'aide de ClustalW2 (9).

### 1.3. Principales fonctions des ligases CWH

Les ligases appartenant à la famille CWH influencent diverses voies de signalisation à la base de processus cellulaires importants comme la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation ainsi que l'apoptose. Ces processus sont ultimement impliqués dans le développement ainsi que dans le maintien de fonctions cellulaires normales ou leur dérèglement entraînant la formation de tumeurs (11).

La fonction la plus connue accomplie par une ligase de type CWH est sans doute la régulation des canaux sodiques par Nedd4. Ces canaux sont particulièrement présents sur la surface apicale des cellules épithéliales situées dans le tube contourné distal des reins et permettent le maintien de l'homéostasie par l'entrée de sodium dans la cellule. L'ubiquitylation de ces canaux par Nedd4 entraîne une diminution de leur expression en surface, limitant leur nombre et ainsi l'entrée de sodium. Les patients atteints du syndrome de Liddle présentent en effet des symptômes d'hypertension résultant d'une mutation qui abolit le motif de liaison de Nedd4 présent sur les canaux sodiques (12,13). Nedd4 représente donc l'archétype des ligases CWH (souvent désignées famille Nedd4)

Nedd4 est également connu pour son implication dans le système immunitaire. Les cellules T Nedd4<sup>-/-</sup> présentent effectivement un niveau élevé de Cbl-b (Casitas B-Lineage Lymphoma), une protéine importante inhibant l'activation des cellules T. En l'absence de Nedd4, les cellules T se développent normalement, mais présentent une prolifération réduite, ce qui entraîne une mauvaise coopération avec les cellules B dans la réponse immunitaire (14,15). Une autre ligase de la famille CWH présente des effets majeurs sur le système immunitaire, il s'agit de la protéine Itch à l'étude dans cette thèse. L'absence de cette dernière chez la souris cause divers problèmes inflammatoires en plus d'être associée à une irritation constante de la peau à l'origine du nom de cette ligase (16). Itch et Nedd4 étaient initialement considérées comme redondantes, puisqu'elles ciblaient plusieurs substrats communs (14,17-19). Cependant, plusieurs différences phénotypiques sont observables entre les souris Nedd4<sup>-/-</sup> et Itch<sup>-/-</sup>, ce qui démontre un certain degré de spécificité de ces ligases (14,20,21). En particulier, Itch régule négativement la voie de signalisation NF-κB et l'activité du facteur de transcription JunB dans les cellules T (14,22). Une mutation ponctuelle entraînant la perte de

la majorité de la protéine chez l'humain fut ainsi associée à plusieurs désordres auto-immunitaires causés par l'infiltration de cellules inflammatoires dans les poumons, le foie et l'intestin en plus d'être associée à différents retards dans la croissance et le développement (23).

## **1.4. Architecture de la famille CWH**

### **1.4.1. Domaine C2**

Les ligases de la famille CWH possèdent toutes à leur extrémité N-terminale un domaine C2. Ce domaine interagit avec les phospholipides membranaires et est responsable de la localisation membranaire de ces protéines (24-26). L'interaction de certains domaines C2 avec les phospholipides dépend de la présence de calcium, mais d'autres sont considérés comme calcium-indépendant en raison de leur faible affinité pour cet ion (27). Les résidus composant certaines boucles permettent de moduler l'affinité pour certains types de phospholipides et ainsi influencer la localisation intracellulaire des ligases CWH (27,28). Ainsi, on retrouve principalement Itch au niveau du trans-Golgi et des endosomes tardifs tandis que Nedd4 est principalement localisée au niveau de la membrane plasmique et du Golgi (24,25,29). En comparaison, Rsp5p, l'unique homologue de ces protéines chez *S. cerevisiae* est située à la membrane plasmique ainsi qu'à plusieurs endroits le long de la voie endocytaire (26).

### **1.4.2. Domaines WW**

Les ligases de la famille CWH contiennent entre 2 et 4 domaines WW. Le nom de ces domaines provient de la présence de deux résidus tryptophanes bien conservés au sein d'une séquence d'environ 40 acides aminés (30). Ces modules permettent la liaison de courts motifs

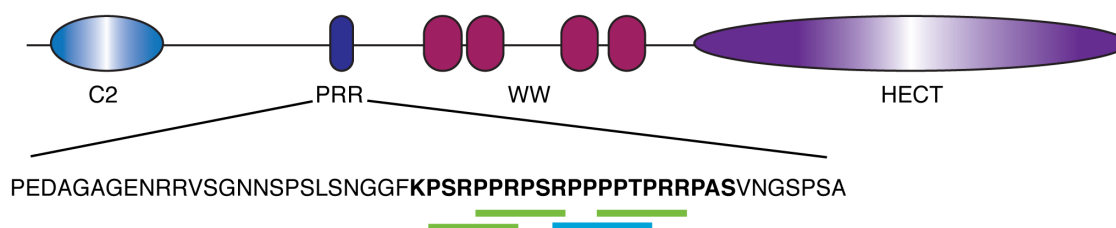
à base de prolines comme les séquences PPxY (groupe I), les séquences PPLP (groupe II), les séquences PPR (groupe III) ainsi que les motifs phospho(S/T)P. Certains de ces motifs ressemblent aux séquences reconnues par les domaines SH3 avec qui les domaines WW partagent quelques similitudes au niveau de leur surface d'interaction avec ces peptides. Ainsi, le repliement des domaines WW crée une poche hydrophobe allongée pouvant accommoder deux résidus prolines adjacents comme dans le cas des motifs PPxY (31-33). Malgré la présence de plus d'un domaine WW au sein des ligases de la famille CWH, ces domaines ne contribuent pas de façon égale aux diverses interactions. Par exemple, les domaines WW1 et WW2 de Nedd4-2 permettent son interaction avec les canaux calciques TRPV6 tandis que les domaines WW3 et WW4 interagissent avec les canaux sodiques (34,35).

### **1.4.3. Domaine HECT**

Le domaine HECT confère aux ligases de l'ubiquitine leur activité catalytique. Ce domaine permet le transfert de l'ubiquitine au substrat. Il est constitué de deux lobes, le lobe C et lobe N. Le lobe N est constitué de deux sous-domaines permettant la liaison de l'enzyme E2 et de l'ubiquitine (36,37). Bien que le mécanisme précis permettant l'ubiquitylation par ces domaines demeurent un sujet de débat, plusieurs évidences montrent qu'une même ligase pourrait permettre différents types d'ubiquitylation. Itch est ainsi en mesure de promouvoir la dégradation de Dvl en induisant sa polyubiquitylation via la lysine K48 (38). La protéine Deltex est aussi dégradée par Itch, bien que ce phénomène implique l'ubiquitylation K29 du substrat (39). D'autres types d'ubiquitylation sont aussi observables. Ainsi, Itch cause l'ubiquitylation K27 de TIEG1 (TGF- $\beta$ -Inducible Early Gene 1) afin d'empêcher sa translocation au noyau (40). Finalement, Itch subit aussi sa propre médecine en catalysant la formation de chaînes d'ubiquitine K63 sur elle-même (41,42).

## 1.5. Région riche en prolines

Les séquences comprises entre les domaines communs aux ligases de la famille CWH ne sont pas conservées entre les espèces, de même qu'entre les différentes ligases. Une région située entre le domaine C2 et les domaines WW d'Itch fait cependant exception à cette règle et présente une bonne conservation chez les vertébrés. Une telle PRR est unique à Itch parmi les ligases CWH et est composée d'une vingtaine de résidus (Figure 1-4). Cette séquence lui confère la capacité d'interagir avec différentes protéines contenant un domaine SH3. Ce module permet à Itch de lier des protéines distinctes par rapport aux autres membres de cette famille, ce qui lui confère une spécificité additionnelle (1).



**Figure 1-4. Organisation modulaire de la ligase de l'ubiquitine Itch.**

En plus des domaines conservés parmi les ligases de la famille CWH, Itch possède aussi une région riche en prolines. Cette région comporte un motif de classe I (bleu) ainsi que trois motifs de classe II (vert) permettant la liaison de protéines contenant un domaine SH3.

## 1.6. Les domaines SH3

Les domaines SH3 sont composés d'une soixantaine d'acides aminés comportant 5 à 6 brins  $\beta$  disposés en deux feuillets antiparallèles présentant une région relativement plane et hydrophobe pouvant lier des peptides PRR (Figure 1-5) (43). Les premières études sur la liaison PRR/SH3 ont démontré que le domaine SH3 se fixe sur une séquence riche en proline

adoptant la forme minimale PxxP (44). Cette séquence prend la forme d'une hélice PPII (Polyproline-2) composée d'environ 3 acides aminés par tour. Cette structure présente un aspect triangulaire en coupe transversale et c'est cette forme particulière qui va permettre la fixation du PRR sur le SH3. Ce dernier est formé de deux poches hydrophobes définies par des résidus aromatiques. Ces poches vont accueillir les résidus prolines se trouvant consécutivement du même côté de l'hélice formée par le peptide PRR et ainsi contribuer grandement à la force de liaison. Une troisième poche composée de résidus acides est présente sur la surface du SH3 et constitue la poche de spécificité accueillant le résidu chargé positivement qui complète le motif PxxP. Des études structurales portant sur les complexes SH3-PRR ont permis d'identifier deux orientations possibles du peptide par rapport au SH3 (45). Cette orientation est dictée par la position du résidu chargé par rapport au PxxP, lequel contribue à l'affinité du complexe en établissant un pont salin avec les résidus acides de la boucle RT du domaine SH3 composant la poche de spécificité. On distingue donc parmi les PRR deux classes principales de motifs de liaison aux domaines SH3, soit les motifs de classe I (+xxPxxP) ainsi que les motifs de classe II (PxxPx+) (31). Cependant, la définition d'un nombre grandissant de séquences consensus ciblées par différents domaines SH3 ainsi que la détermination de la structure de ces complexes ont permis d'identifier plusieurs peptides interagissant avec les domaines SH3 qui ne possèdent aucun motif appartenant à ces grandes classes. Différents domaines SH3 sont ainsi en mesure d'interagir avec diverses séquences atypiques. Certaines séquences reconnues ne possèdent pas de motifs PxxP tandis que d'autres impliquent un tel motif, mais dont l'environnement immédiat diffère des motifs de liaisons classiques (classe I ou II). De plus, certaines protéines à domaine SH3 telle que Gads reconnaissent le même motif RxxK porté par différents ligands tandis que d'autres domaines

SH3 comme celui de  $\beta$ -PIX (PAK-Interacting Exchange Factor Beta) possèdent à la fois la capacité d'interagir avec des motifs de classe I ou encore un motif atypique (46). Bien que les domaines SH3 présentent une apparente conservation au sein de leurs séquences et un repliement similaires, de subtiles variations au niveau des résidus clés situés à la surface de liaison permettent à ces domaines de reconnaître une variété de peptides PRR. Ceux-ci emploient différents mécanismes moléculaires permettant la reconnaissance du substrat. Généralement, les interactions SH3-PRR présentent une affinité moyenne (1-200  $\mu$ M) (43,47). Il est intéressant de constater que certains de ces complexes montrent une affinité remarquable de l'ordre du nanomolaire et que ces complexes impliquent tous la reconnaissance d'un peptide atypique (48).

## **1.7. Protéines interagissant avec la ligase Itch**

La vaste majorité des protéines liant la ligase de l'ubiquitine Itch interagissent avec ses domaines WW (Tableau 1-1). Parmi les substrats liant ces domaines, Notch et c-Jun sont sans doute les partenaires les plus connus. Ces partenaires sont respectivement associés aux rôles de Itch dans l'autoimmunité ainsi que dans la différenciation des cellules T et l'anergie (1,49,50).

Contrairement à l'abondance des recherches portant sur les interactions établies via les domaines WW de la ligase Itch, relativement peu d'informations sont disponibles quant aux interactions impliquant sa PRR et c'est pourquoi nous avons mis l'accent dans cette thèse sur ces interactions plutôt que sur celles établies par ses domaines WW. La PRR d'Itch est composée de 6 résidus chargés positivement ainsi que 10 prolines, créant une diversité de motifs de liaison potentiels pour différents domaines SH3. Ces derniers se chevauchent au sein

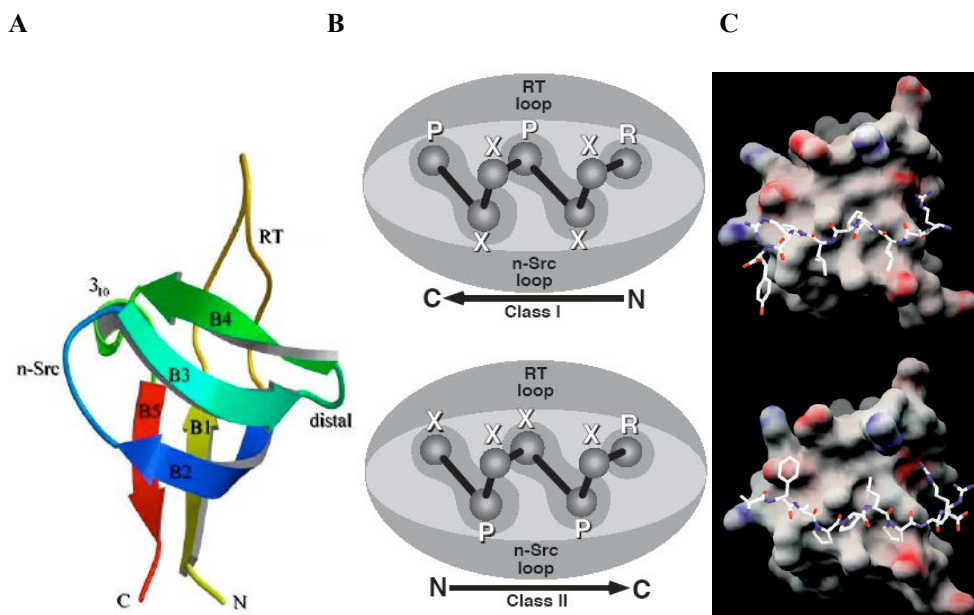
d'une séquence compacte d'une vingtaine d'acides aminés comportant un motif de classe I de même que trois motifs de classe II. On connaît cependant peu de choses concernant les préférences de liaison de ce module d'interaction ainsi que ses impacts au niveau cellulaire. Les protéines interagissant spécifiquement avec la PRR de Itch connues à ce jour sont l'Endophilin,  $\beta$ -PIX, CIN85 (Cbl-Interacting Protein of 85 kDa), STAM-1 (Signal Transducing Adapter Molecule 1) ainsi que SNX (Sorting Nexin) 9 et 18 (24,51-53).

**Tableau 1-1. Protéines interagissant avec la ligase Itch\* . (1,49,50)**

Protéines liant les domaines WW	Fonction	Processus cellulaire
c-Flip	Protéine inhibitrice de l'apoptose	Régulation de l'apoptose
c-Jun	Facteur de transcription	Régulation de la différenciation des cellules T <sub>H</sub> 2 / anergie
clAP	Ligase de l'ubiquitine	Régulation de la signalisation inflammatoire
CXCR4	Récepteur couplé aux protéines G	Tri des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) activés par un agoniste
Deltex	Régulation de la signalisation Notch	Régulation de l'autoimmunité
Dvl	Protéine de polarité	Régulation de la signalisation Wnt
ErbB4	Récepteur de facteurs de croissance	Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), cancer
Gli	Facteur de transcription	Répression de la signalisation Hedgehog
Hrs	Protéine de l'endocytose	Tri des cargos protéiques
Itch	Ligase de l'ubiquitine	Influence la stabilité protéique, régulation de son activité catalytique
Jun-B	Facteur de transcription	Régulation de la différenciation des cellules T <sub>H</sub> 2 / anergie
LATS1	Kinase	Régulation de la signalisation Hippo, cancer
MAVS	Adaptateur protéique	Infections virales
MKK4	Kinase	Régulation de la signalisation JNK, réponse au stress
Notch	Facteur de transcription	Régulation de l'autoimmunité
P63	Facteur de transcription	Régulation de l'apoptose, développement épithélial, cancer
P73	Facteur de transcription	Régulation de l'apoptose, développement neural, cancer
PKC- $\theta$	Kinase	Régulation de l'anergie des cellules T
PLC- $\gamma$ 1	Phospholipase	Régulation de l'anergie des cellules T
Smad2	Smad activé par les récepteurs	Activation de la signalisation par le récepteur TGF $\beta$
TAK1	Kinase	Régulation de la signalisation NF $\kappa$ B, réponse au stress
tBid	Protéine pro-apoptotique	Régulation de l'apoptose
TIEG1	Facteur de transcription	Activation de la signalisation par le récepteur TGF $\beta$
TRPV4, TRPC4	Canaux ioniques	Régulation du recyclage des canaux et leur abondance à la membrane
<b>Protéines liant la PRR</b>		
$\beta$ -PIX	GEF	Réarrangements du cytosquelette
CIN85	Protéine de l'endocytose	Régulation de l'endocytose de l'EGFR
Endophilin A1	Protéine de l'endocytose	Régulation de l'endocytose de l'EGFR
SNX9, SNX18	Protéine de l'endocytose	Tri des cargos protéiques
STAM-1	Protéine de l'endocytose	Tri des cargos protéiques

\* Résumé dans (1,49,50) et les références incluses



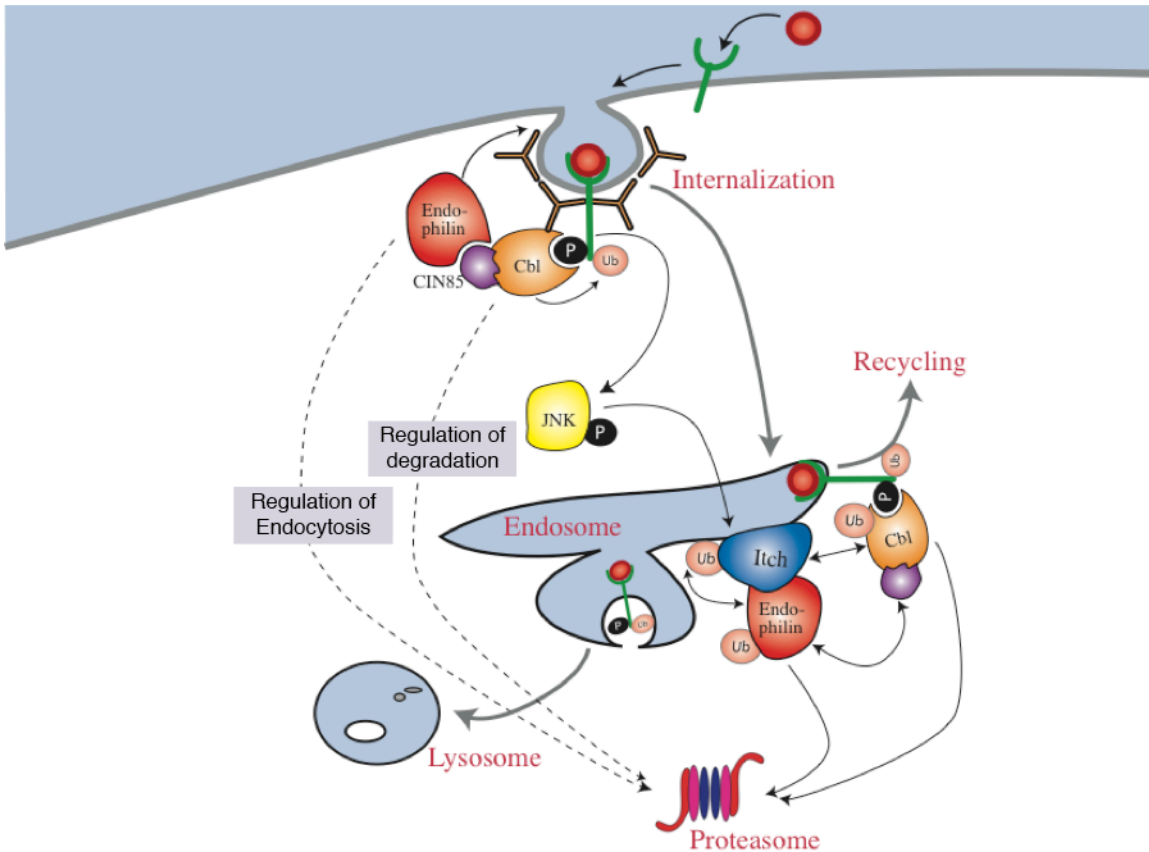


**Figure 1-5. Différentes représentations du domaine SH3 montrant la liaison de la PRR (43,54).**

A, Topologie typique d'un domaine SH3 montrant l'arrangement des brins  $\beta$  reliés entre autre par les boucles RT et n-Src. B, Représentation schématique du domaine SH3 montrant la liaison de la PRR selon les deux orientations possibles (Classe I en haut et classe II en bas). C, Liaison du domaine SH3 de Src avec un ligand de classe I (Haut) ou II (Bas). Le peptide PRR est représenté sous forme de bâtonnets tandis que la surface du SH3 est modélisée à l'aide de GRASP (43,54).

### 1.7.1. Endophiline et CIN85

Cinq gènes codent les différents isoformes de l'Endophiline chez l'humain. L'Endophiline 1 (aussi appelée A1) est exprimée seulement dans le cerveau tandis que la présence d'Endophiline 2 est ubiquitaire. L'Endophiline 3 est aussi exprimée dans le cerveau



**Figure 1-6. Modèle de l'internalisation du récepteur de l'EGF.**

L'activation du récepteur de l'EGF induit la formation d'un complexe avec l'Endophiline, CIN85 et Cbl. Cette dernière est nécessaire à l'endocytose du récepteur en induisant son ubiquitylation. La stimulation à l'EGF permet aussi l'activation de la kinase JNK responsable de la phosphorylation et de l'activation d'Itch. Cette ligase est présente notamment au niveau des endosomes où elle est en mesure d'interagir avec les protéines internalisées. Ainsi, Itch régule l'expression de Cbl et de l'Endophiline en induisant leur ubiquitylation et en restreignant leur participation dans l'endocytose du récepteur de l'EGF.

et les testicules (55). En plus de ces isoformes, deux autres gènes codent aussi pour des protéines similaires soient les Endophilines B1 et B2. Ces protéines sont présentes dans une

variété de tissus incluant le cerveau (56). L'Endophiline B1 est une protéine notamment impliquée dans la maintenance de la morphologie mitochondriale en affectant plus spécifiquement la membrane externe de la mitochondrie (57). L'Endophiline B1 retarde aussi la dégradation du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) en séquestrant les récepteurs au niveau des endosomes et en retardant leur cheminement vers les lysosomes (58). Une fonction bien caractérisée de l'Endophiline B1 est son rôle dans la régulation de l'autophagie. L'Endophiline B1 participe alors à la formation des autophagosomes en interagissant indirectement avec PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) via l'UVRAG (Ultraviolet irradiation resistant-associated gene) en plus de réguler le trafic des vésicules marquées par la présence de la protéine Atg9 (Autophagy related gene 9) (59-64). L'Endophiline B2 est quant à elle impliquée dans le cytosquelette et permettrait de stabiliser le réseau de filaments de Vimentine en périphérie du noyau en plus d'influencer la position de ce dernier (65). L'Endophiline B2 est aussi recrutée par CPG2 (Candidate plasticity gene 2) aux filaments d'actine afin de permettre l'internalisation des récepteurs de glutamate (66).

Les différentes isoformes de l'Endophiline partagent une structure commune formée d'un domaine BAR situé en N-terminal, une région centrale variable ainsi qu'un domaine SH3 à l'extrémité C-terminale. Le domaine BAR (aussi appelé N-BAR) de l'Endophiline est précédé d'une hélice amphipathique pouvant s'insérer dans la membrane plasmique afin d'induire sa courbure dans un mécanisme faisant intervenir la dimérisation de ses domaines BAR (67-70). Le domaine SH3 des Endophilines A est en mesure de lier des protéines arborant une PRR. Il est intéressant de constater que ces isoformes sont toutes en mesure de lier à différents degrés la Dynamine et la Synaptojanine, ce qui suggère une fonction générale des Endophilines A dans l'endocytose. Leurs préférences de liaison envers les PRR de ces

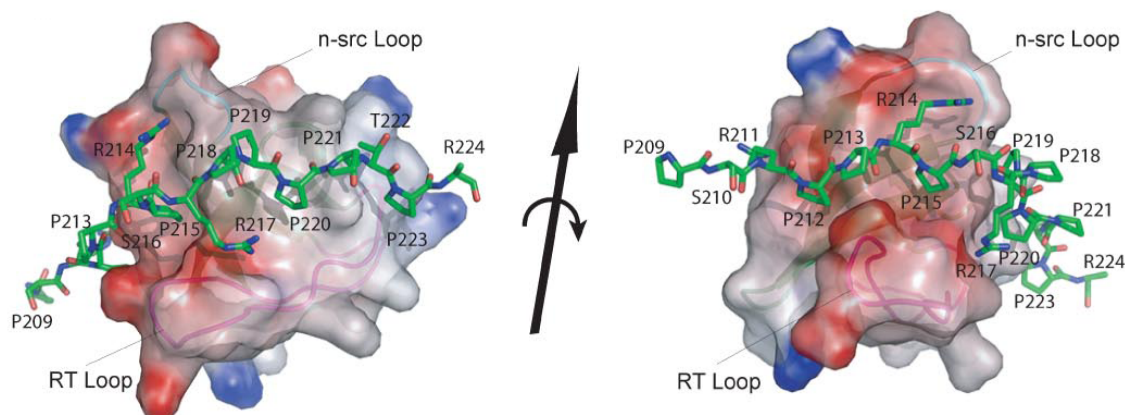
protéines démontrent une grande similitude dans les motifs reconnus (71,72). Bien qu'elles soient très similaires aux Endophilines A, les isoformes B seraient plutôt localisés au niveau du Golgi et ne participeraient pas aux stades précoces de l'endocytose. Ils seraient aussi impliqués le trafic intracellulaire. Contrairement à l'Endophiline A, L'Endophiline B serait incapable de lier la Synaptojanine (56,73). L'Endophiline A1 (ou Endophiline 1) est sans doute l'isoforme le plus étudié. Il fut d'ailleurs le premier partenaire identifié liant spécifiquement la PRR de la ligase Itch via son domaine SH3 (24). Le domaine SH3 de l'Endophiline A1 est en mesure de lier, en plus des PRR, le domaine Ubl (Ubiquitin-like) de la ligase Parkin. Bien qu'elle soit atypique, cette interaction possède une affinité comparable à celle observée pour la liaison du domaine SH3 de l'Endophiline à une PRR telle que celle de la Synaptojanine (74).

Les interactions établies par le domaine SH3 de l'Endophiline A1 sont aussi importantes afin de permettre la fission des vésicules endocytées par la voie dépendante de la clathrine en plus de participer au désassemblage du manteau une fois la vésicule formée (75-77). Le récepteur de l'EGF est un bon exemple de RTK (Récepteur Tyrosine Kinase) dont l'endocytose s'effectue par la voie dépendante de la clathrine. Il fut démontré que suivant son activation, l'internalisation de ce RTK tout comme celle du récepteur de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) s'effectue via la formation d'un complexe protéique avec l'Endophiline, CIN85 et la ligase de type RING Cbl (Figure 1-6) (78,79). Cette dernière peut alors ubiquityler le récepteur, favorisant son endocytose (80). Il est intéressant de constater qu'Itch est aussi en mesure de lier CIN85 et Cbl, bien que ces interactions reposent sur différents modules d'interaction de la ligase. Ainsi, les domaines WW d'Itch permettent son interaction avec Cbl, alors qu'un motif PxxxPR situé au sein de sa PRR pourrait permettre l'interaction

avec l'un des trois domaines SH3 de CIN85 (19,52). La stimulation par l'EGF entraîne en plus de ces interactions une cascade de signalisation comprenant notamment l'activation de la voie JNK. Cette kinase est alors en mesure de phosphoryler Itch. Cette modification a pour effet d'augmenter son affinité envers ses partenaires Cbl et Endophiline, ce qui stimule leur ubiquitylation et cause leur dégradation protéasomale. Itch permettrait ainsi de réguler indirectement le niveau de récepteurs présents à la surface de la cellule en restreignant la participation de ces substrats dans le phénomène d'endocytose (81). Bien que l'interaction entre Itch et l'Endophiline soit bien caractérisée au niveau fonctionnel, on connaît peu de choses concernant les préférences de liaison de son domaine SH3 envers la PRR d'Itch. La séquence consensus de liaison de cette protéine à domaine SH3 déterminée à partir de sa liaison à la PRR de la Synaptojanine est PxRPPxP (71). Itch possède par ailleurs deux de ces motifs au sein de sa PRR pouvant potentiellement lier l'Endophiline.

La participation de l'Endophiline ne se limite pas à l'endocytose dépendante de la clathrine. Cette protéine constituerait aussi une voie rapide et alternative d'endocytose FEME (Fast Endophilin-mediated endocytosis) effectuée sans la participation de la clathrine ni de l'AP-2. Ce mécanisme fait intervenir la déphosphorylation des phosphatidylinositol phosphates permettant le recrutement de la Lamellipodine, dont la PRR pourra à son tour recruter l'Endophiline via son domaine SH3. Ce type d'endocytose se produirait principalement au niveau des bords proéminents de la cellule et permettrait l'endocytose de nombreux récepteurs membranaires activés dont plusieurs RCPG (Récepteurs Couplés aux Protéines G) et RTK (82).

### 1.7.2. $\beta$ -PIX



**Figure 1-7. Structure du complexe formé entre le domaine SH3 de  $\beta$ -PIX et la région riche en proline d'Itch (52).**

Bien que ces protéines forment un complexe super SH3 en solution, le cristal ne montre que l'interaction établie par un seul domaine SH3 de  $\beta$ -PIX. Celui-ci lie un ligand de classe I constitué des résidus 217, 220 et 223 (pdb : 2P4R) (52).

La région riche en prolines de la ligase Itch permet la liaison de  $\beta$ -PIX via son domaine SH3 (52). En plus de ce domaine de liaison protéique,  $\beta$ -PIX possède un domaine PH (Pleckstrin Homology) lui conférant une activité GEF (Guanine Exchange Factor). Cette activité affecte les petites GTPases Rac et Cdc42 (Cell Division Control Protein 42) qui à leur tour vont influencer l'activation de PAK (p21-Activated Kinase) et son impact sur l'organisation du cytosquelette. Cette kinase, tout comme Itch, est en mesure d'interagir directement avec le domaine SH3 de  $\beta$ -PIX (83-85). Le domaine SH3 de  $\beta$ -PIX permet aussi la liaison de la ligase Cbl (86). Cette ligase est notamment responsable de l'ubiquitylation du récepteur de l'EGF requise pour son internalisation (80). Le complexe  $\beta$ -PIX-Cdc42 interfère

alors avec cette fonction en séquestrant Cbl et en l'empêchant de participer à l'endocytose de l'EGFR (87-89).

Différentes structures permettent d'illustrer les mécanismes de liaison entre le domaine SH3 de  $\beta$ -PIX et ces diverses protéines contenant une PRR (52,84,86). Parmi elles, une structure obtenue par cristallographie démontre l'interaction entre  $\beta$ -PIX et la PRR de la ligase Itch (Figure 1-7) (52). Cette structure représente les seules données structurales disponibles concernant les interactions établies par ce module unique à Itch parmi les ligases de la famille CWH. Le peptide PRR de Itch y adopte la forme d'une hélice PPII exposant un motif classe I qui interagit avec la face principale du SH3. Une particularité de ce complexe est que le peptide est replié, ce qui lui permet de lier simultanément une face additionnelle du domaine SH3 de  $\beta$ -PIX. Des analyses par ITC (Titration Calorimétrique Isothermale) démontrent une autre particularité du complexe n'étant pas représentée dans le cristal. Il s'agit d'une stoechiométrie atypique impliquant la liaison des domaines SH3 provenant de deux protéines  $\beta$ -PIX différentes liant simultanément la PRR de Itch. Ce type de liaison particulière se nomme super SH3 et constitue un phénomène rare parmi les protéines contenant un domaine SH3 (90). Un tel complexe fut toutefois observé dans le cas de l'interaction entre  $\beta$ -PIX et la PRR de Cbl, alors que le complexe formé avec celle de PAK montre plutôt une stoechiométrie de 1:1 (84,86). Il est intéressant de constater que malgré une surface de contact étendue, ces interactions super SH3 montrent une affinité comparable à la plupart des complexes SH3-PRR connus. Bien que les propriétés de la liaison de  $\beta$ -PIX avec la PRR de Itch soient partiellement caractérisées, la fonction d'une telle interaction demeure à ce jour inconnue (52).

### 1.7.3. SNX 9 et 18

Les protéines SNX sont une famille de protéines diversifiées comprenant 33 membres différents chez l'humain. Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine PX (Phox) particulier leur permettant de lier le PIP3 (Phosphatidylinositol-3-Monophosphate) enrichi au niveau des endosomes précoces. En plus de cette fonction, les protéines SNX sont responsables du tri protéique effectué au niveau des endosomes ainsi que la signalisation émanant de ce compartiment. Parmi ces protéines SNX, la sous-famille SNX-BAR contient en plus un domaine BAR participant à la courbure de la membrane plasmique. Il y a 12 SNX-BAR différentes chez l'humain et seulement trois membres possèdent aussi un domaine SH3. Ce sous-groupe est constitué des protéines présentant la même architecture caractéristique soit SNX9, 18 et 33 (91,92). Ces trois protéines diffèrent principalement au niveau l'inter-domaine situé entre le domaine SH3 et le domaine PX, une région influençant leur localisation. Ainsi, SNX9 est principalement localisée au niveau des sites d'endocytose de la membrane plasmique alors que SNX18 est plutôt associée aux endosomes (92,93). Le domaine SH3 de ces différentes protéines cible un motif de classe I modifié (RxAPxxP) présent au sein de la dynamine 1 et 2 ainsi que les régulateurs de l'actine WASP (Wiskott–Aldrich Syndrome protein) et N-WASP (92,94,95). Ces interactions suggèrent que la fonction de ces protéines se situe à l'interface entre l'endocytose et le cytosquelette. En plus de ces protéines, SNX9 est en mesure de lier la kinase ACK2 (Activated Cdc42-Associated Kinase-2) impliquée dans l'endocytose par la voie dépendante de la clathrine. Il est intéressant de noter que la surexpression de ces protéines combinées à une stimulation par l'EGF entraîne une diminution de la quantité d'EGFR disponible. Ceci suggère une fonction de ces protéines dans la dégradation de ces récepteurs (96). L'identification de la séquence consensus liée par le

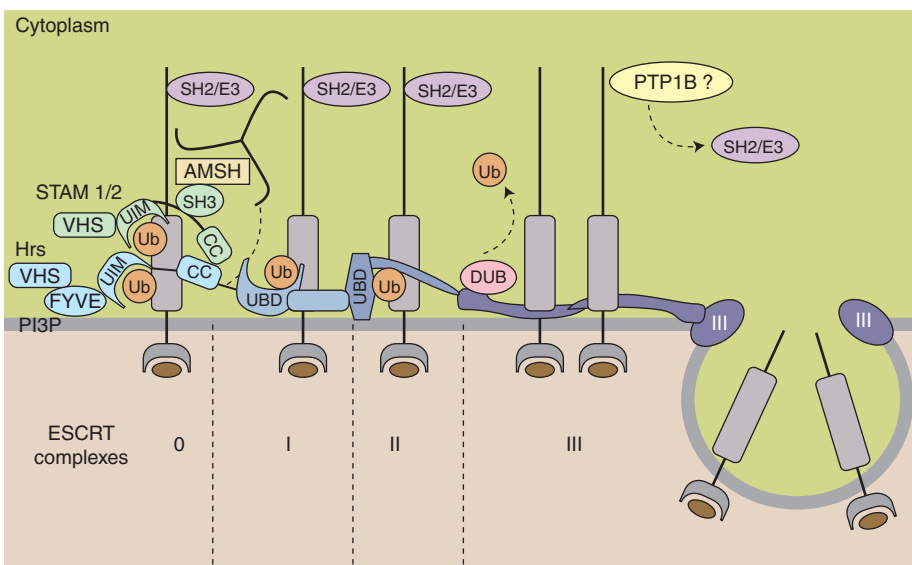


domaine SH3 de SNX9 chez ACK2 et la Synaptojanine ne respecte cependant pas le consensus établit pour d'autres partenaires. Ainsi, le domaine SH3 de SNX9 serait en mesure de lier des séquences riches en prolines variées qui ne présentent pas de consensus clair (94,97).

La région riche en prolines de la ligase Itch est en mesure d'interagir avec le domaine SH3 de SNX9, bien que ses préférences de liaison envers Itch demeurent inconnues. Cette interaction entraine l'ubiquitylation de SNX9 ainsi que sa dégradation. Le rôle spécifique de l'interaction entre Itch et SNX9 demeure cependant largement inconnu. On peut spéculer que celle-ci permette de restreindre la participation de SNX9 dans l'endocytose, tel que démontré dans le cas de l'Endophiline (24,51). En plus de SNX9, Itch est aussi en mesure d'interagir avec SNX18, une autre protéine de la sous-famille SNX-BAR ayant des propriétés analogues (51,98).

La protéine STAM-1 est une protéine associée à la régulation de la signalisation cellulaire induite par les récepteurs de même que leur trafic intracellulaire. Cette protéine se lie à Hrs (Hepatocyte Growth Factor-Regulated Tyrosine Kinase Substrate) et ces dernières constituent le complexe ESCRT-0 (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport-0) (Figure 1-8). Ces protéines contiennent un domaine UIM (Ubiquitin-Interacting Motif) qui leur permettent de lier les protéines ubiquitylées dont le tri s'effectue au niveau des endosomes. Elles permettent ainsi d'assurer le transport et le bon cheminement de ces protéines dans les endosomes/MVBs (Multivesicular Bodies). Ainsi, STAM-1 est en mesure de lier les récepteurs de type RTKs. Ceci empêche leur recyclage et favorise la transition vers les complexes ESCRT (I, II et III) nécessaire pour les acheminer vers les lysosomes afin d'y être dégradés (99,100). STAM-1 possède un domaine SH3 lui permettant d'interagir avec des

### 1.7.4. STAM-1



**Figure 1-8. Implication des complexes ESCRT dans le transfert des récepteurs des MVBs vers le domaine intraluminaire de ces vésicules (100).**

Les récepteurs internalisés au niveau des corps multivésiculaires interagissent avec le complexe ESCRT-0 formé de STAM et Hrs. Ces protéines contiennent un UIM permettant la liaison du récepteur ubiquitylé. Hrs est aussi en mesure d'interagir avec la clathrine de même qu'avec les phospholipides membranaires. STAM permet quant à elle le recrutement de protéases de l'ubiquitine telle que AMSH via son domaine SH3. Le complexe ESCRT-0 va favoriser la transition vers les complexes ESCRT-I, II et III. Ceux-ci ne possèdent pas de domaines UIM et seraient chargés de séquestrer les récepteurs lors de la formation des vésicules au sein même des MVBs. Ces vésicules intraluminaires impliquent le déubiquitylation du récepteur et probablement sa déphosphorylation avant que ce dernier ne soient acheminés vers les lysosomes afin d'y être dégradés. Le désassemblage du complexe ESCRT-III est finalement accompli par Vps4 (100).

motifs RxxK atypiques retrouvés chez deux protéases de l'ubiquitine soit AMSH (Associated Molecule with the SH3 Domain of STAM) et USP8 (Ubiquitin-specific protease 8) (101,102). Cette dernière régule indirectement la dégradation des RTKs en affectant la stabilité de STAM et Eps15 (Epidermal Growth Factor Receptor Substrate 15) (103,104). AMSH est quant à elle en mesure de débiquityler directement les récepteurs de type RTK, avec pour effet de réduire leur dégradation (100,105,106). En plus de ces récepteurs, AMSH affecte aussi le trafic du récepteur CXCR4 appartenant à une autre classe de récepteurs, soit les RCPG (102). Les interactions établies par STAM-1 avec les protéases de l'ubiquitine via son domaine SH3 permettent donc de réguler la stabilité ainsi que le trafic intracellulaire de ces différents récepteurs.

La ligase Itch est une autre enzyme pouvant lier le domaine SH3 de STAM-1. Cette liaison est différente de celles présentées précédemment, puisqu'elle ne repose pas entièrement sur la présence du domaine SH3 ou encore de la région riche en prolines de Itch. En effet, leur abolition permet tout de même un certain degré d'interaction entre ces molécules (53). Une sous-population d'Itch et STAM-1 forment un complexe au niveau des cavéoles. STAM-1 est alors ubiquitylé par Itch, ce qui influence la signalisation ERK1/2 induite via l'activation de CXCR4. En effet, la diminution de l'expression de STAM-1 par siRNA montre une diminution significative de l'activation de la voie ERK1/2 induite suite à la stimulation des récepteurs CXCR4. À l'inverse, la surexpression de ces protéines permet de stimuler l'activation de cette voie de signalisation. Cet effet dépend de l'interaction entre Itch et STAM-1 ainsi que de l'activité ligase d'Itch au niveau des cavéoles (53). Il est intéressant de constater que ce rôle joué par une sous-population d'Itch n'a pas de lien avec sa fonction principale dans la liaison du récepteur CXCR4 et son ubiquitylation. Ce mécanisme serait

donc distinct de son effet au niveau des cavéoles et interviendrait plutôt dans l'endocytose clathrine-dépendante de ces récepteurs (107,108).

## **1.8. Protéines de l'endocytose possédant un PRR permettant le recrutement de différentes protéines à domaine SH3**

La description des différentes protéines capable de lier Itch via sa PRR démontre une implication générale de ses substrats dans l'endocytose. Ce processus cellulaire fait intervenir la formation de multiples liens protéiques, notamment au sein de larges complexes. La présence d'un module PRR permet alors le recrutement des protéines contenant un domaine SH3. La PRR d'Itch pourrait donc, à l'instar d'autres protéines contenant une telle région dont la fonction est bien caractérisée, permettre l'établissement des réseaux d'interactions protéiques nécessaires à l'endocytose. La Dynamine et la Synaptojanine sont deux exemples de protéines qui possèdent une PRR leur permettant de lier plusieurs protéines à domaine SH3 impliquées dans l'endocytose. Voici un résumé de leurs fonctions ainsi qu'un aperçu des domaines SH3 liées par ces protéines.

### **1.8.1. Synaptojanine**

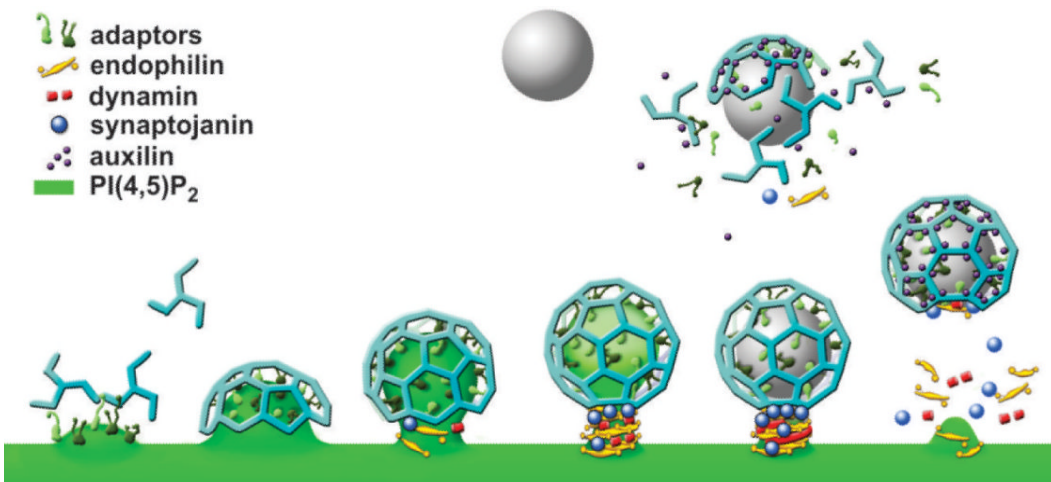
Le gène codant la Synaptojanine 1 est épissé de façon alternative, ce qui permet l'expression de deux transcrits (145 kDa et 170 kDa). Ces isoformes possèdent une architecture commune, la forme longue possédant une PRR additionnelle. La forme courte est bien caractérisée et retrouvée en grande concentration dans le cerveau et plus précisément au niveau des vésicules endocytées par la voie dépendante de la clathrine (Figure 1-9) (109). Les transcrits de la Synaptojanine 1 ont la particularité de posséder deux domaines phosphatases (110). Le domaine Sac1 (Suppressor of Actin) situé en N-terminal permet de déphosphoryler

le phosphate aux positions 3 et 4 de l'inositol tandis que le domaine adjacent 5-phosphatase permet de retirer le phosphate en position 5 (111,112). On constate d'ailleurs chez des souris mutantes déficientes en Synaptojanine une accumulation de PIP2 au niveau des neurones associée à une mortalité périnatale. Cette concentration de PIP2 permet de maintenir un niveau élevé d'affinité entre les protéines adaptatrices formant le manteau de clathrine et la surface de la vésicule, alors que celle-ci doit diminuer drastiquement afin de permettre son désassemblage rapide (111). De plus, l'ablation génétique de la Synaptojanine 1 dans les neurones mène à une accumulation de vésicules de clathrine libres de même qu'à un ralentissement de leur disponibilité suite à leur recyclage, suggérant encore l'implication de la Synaptojanine dans ce phénomène (113). La portion C-terminale de la Synaptojanine 1 contient une région riche en prolines lui permettant d'interagir avec des protéines contenant un domaine SH3. Cette région couvre quelques centaines de résidus et comporte deux motifs de classe I ainsi que huit motifs de classe II. Cette organisation permet la liaison de plusieurs protéines SH3. Différentes études ont permis de mieux cerner les préférences de liaison de ces protéines envers la PRR de la Synaptojanine. Ainsi, plusieurs partenaires lient une séquence commune se chevauchant. Il s'agit de Pacsine 1, FISH (Five SH3 Domain-Containing Protein), Sorbine, Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) et l'Endophiline. L'Amphiphysine, quant à elle, cible deux autres motifs de classe II situés de part et d'autre du site de liaison identifié pour ces autres protéines à domaine SH3 (71,114). En plus de ces protéines, la PRR de la Synaptojanine est aussi en mesure d'interagir avec SNX9 et l'Intersectine (97,115,116). Le nombre de protéines à domaine SH3 ciblées par la Synaptojanine ainsi que leurs fonctions reflètent la versatilité du module de liaison PRR et son implication générale dans l'endocytose. Cette région joue un rôle important dans la fonction

neuronal de cette protéine. Le modèle généralement admis implique le recrutement de la Synaptojanine grâce à sa liaison au domaine SH3 de l'Endophiline (55,117-119). L'abolition de cette liaison SH3-PRR entraîne effectivement une accumulation de vésicules, ce qui suggère que ces protéines ont un rôle dans la fission ainsi que dans le désassemblage du manteau de clathrine (75,77). D'autres mécanismes pourraient cependant être impliqués dans le recrutement de la Synaptojanine puisque l'abolition du domaine SH3 de l'Endophiline n'abolit pas totalement ses fonctions (120). Il est alors possible que la Synaptojanine puisse être recrutée via son interaction avec d'autres protéines à domaine SH3 impliquées dans l'endocytose. D'une façon similaire, la redondance de ces interactions aux sites d'internalisation pourraient peut-être expliquer la récente découverte montrant que l'expression d'une Synaptojanine sans PRR permet tout de même de rétablir le phénotype chez des vers déficients pour cette protéine (121).

La Synaptojanine 2 est une autre isoforme qui présente une structure commune. Cette protéine possède une distribution tissulaire plus étendue et ses domaines Sac1 et phosphatases présentent une homologie de séquence de plus de 50% avec les domaines homologues de la Synaptojanine 1. Sa PRR diffère de la Synaptojanine 1 et comporte 4 motifs de classe I et un nombre équivalent de classe II. Ces divergences au sein de la PRR se traduisent par différentes préférences de liaison. Ainsi, la PRR de la Synaptojanine 1 lie Grb2, l'Amphiphysine I et les Endophilines A1 et A3 alors que la Synaptojanine 2 n'est en mesure de lier parmi ce groupe que Grb2 (122). Ces protéines auraient aussi des fonctions cellulaires distinctes. Ainsi, les neurones de souris déficientes en Synaptojanine 1 ne présentent pas de défauts dans les phases initiales de l'endocytose de clathrine. Ces cellules présentent un nombre élevé de vésicules de clathrine et une augmentation du délai de réentrée des vésicules de recyclage (111,123). À

l'inverse, la déplétion de la Synaptojanine 2 entraîne une diminution du nombre de puits de clathrine. La réintroduction de Synaptojanine 2 sans activité phosphatase ou de Synaptojanine 1 ne permet pas de rétablir cet effet. Ceci indique que les deux isoformes de la Synaptojanine auraient des fonctions distinctes (124).



**Figure 1-9. Schématisation des principales étapes de l'endocytose dépendante de la clathrine (118).**

La clathrine est d'abord recrutée à la membrane par des adaptateurs pour former le manteau enrobant progressivement la vésicule. L'Endophiline intervient dans les stades tardifs. Sa liaison avec la Synaptojanine et la Dynamine permet la maturation et la fission de la vésicule. Le domaine BAR de l'Endophiline et celui d'autres protéines contribuent aussi à la fission de la vésicule (118).

### 1.8.2. Dynamine

Trois gènes codent pour les différents isoformes de la Dynamine (1, 2 et 3) chez les mammifères. Ces gènes peuvent aussi être épissés de façon alternative pour créer une variété de séquences (125). La Dynamine 1 ainsi que la Dynamine 3 sont principalement exprimées dans le système nerveux, bien que le niveau d'expression de cette dernière soit nettement

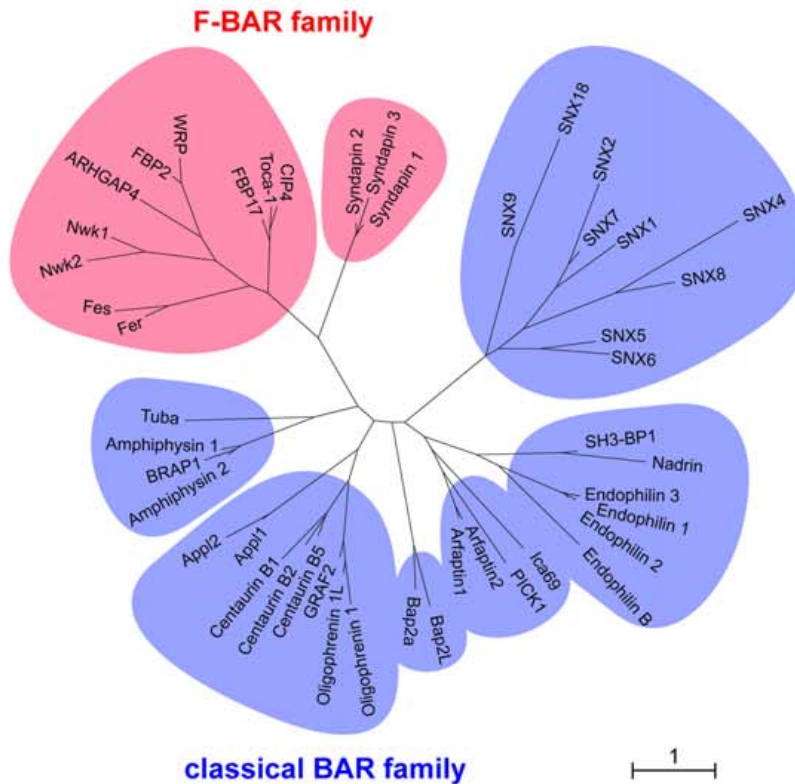
inférieur. La Dynamine 2 est quant à elle exprimée de façon ubiquitaire (125-127). Ces protéines possèdent une architecture similaire formée d'un domaine GTPase en N-terminal. Celui-ci est suivi d'un domaine central ainsi que d'un domaine PH, un domaine GED (GTPase Effector Domain) et une PRR en C-terminal. Les différents isoformes de la Dynamine auraient des fonctions similaires au sein de l'endocytose (128). Ainsi, des souris KO pour la Dynamine 1, qui constitue la majeure partie de la Dynamine présente au niveau des synapses, sont toujours en mesure d'effectuer l'endocytose. Ces cellules présentent toutefois certains défauts comme l'accumulation de protéines au site d'endocytose et la formation de longs tubes vésiculaires (126). Des souris KO pour la Dynamine 3 ne montrent pas d'effets significatifs sur l'endocytose, bien que le double KO pour les Dynamines 1 et 3 entraîne une mortalité périnatale. Il est intéressant de constater que malgré cet impact majeur, les embryons admettent un certain niveau de transmission synaptique. Ces observations laissent penser que ces isoformes aient des fonctions similaires, et que l'expression d'un niveau minimal de Dynamine 2 puisse compenser certaines fonctions accomplies par les autres formes de Dynamine (126,128). La Dynamine permettrait, de façon générale, la fission des vésicules en formation. Cette protéine est recrutée au niveau du cou de la vésicule et un changement de conformation induite par son activité GTPase contribuerait à la constriction de la membrane permettant sa fission. Ce mécanisme est bien caractérisé dans l'endocytose par la voie dépendante de la clathrine, bien que sa participation soit observable dans différents processus endocytiques comme la fission des cavéoles (129,130). La PRR de la Dynamine lui permet d'interagir avec plusieurs protéines contenant un domaine SH3. Les différentes isoformes de la Dynamine contiennent toutes une PRR composée d'une centaine de résidus et contenant plusieurs motifs de classe I et II permettant la liaison de domaines SH3. Cette région serait



responsable du recrutement de la Dynamine au site d'endocytose par différentes protéines contenant à la fois un domaine SH3 ainsi qu'un domaine BAR contribuant à la courbure de la membrane plasmique lors de l'endocytose. L'Endophiline, l'Amphiphysine et SNX9 sont de telles protéines en mesure de lier les différentes isoformes de la Dynamine (71,95,129). En plus de ces protéines, une multitude de domaines SH3 reconnaissent la PRR de la Dynamine. Il est intéressant de constater que bien qu'elles partagent certains partenaires communs tels que Grb2, PLC $\gamma$  et Lyn, les différentes isoformes de la Dynamine n'ont pas toutes les mêmes préférences de liaison (71,131). La Dynamine 1 possède ainsi une PRR versatile reconnaissant plusieurs protéines. Elle est ainsi la seule isoforme pouvant lier le domaine SH3 de Src et Fyn. Les Dynamines 1 et 2 peuvent aussi lier p85 tandis que la Dynamine 3 est incapable de lier cette protéine (131). En plus des partenaires contenant un domaine BAR classique mentionnés précédemment, la Dynamine 1 interagit avec des protéines à domaine SH3 contenant aussi un domaine F-BAR qui, de façon similaire, induit la courbure de la membrane plasmique et permet d'induire sa tubulation (Figure 1-10). On retrouve parmi ces partenaires FBP17, CIP4, Toca-1 et Pacsine (132). Le rôle joué par ces différents partenaires à domaine SH3 permet de conclure à l'importance de la PRR de la Dynamine et son impact sur l'endocytose et la signalisation cellulaire.

## **1.9. Redondance des interactions SH3-PRR**

L'endocytose, la signalisation et le trafic intracellulaire font intervenir un nombre impressionnant d'interactions protéiques. Les liaisons SH3-PRR sont bien représentées parmi celles-ci. L'analyse des interactions établies par la Synaptojanine ainsi que la Dynamine révèle que ces deux protéines impliquées dans l'endocytose interagissent souvent avec les mêmes protéines à domaine SH3 participant aussi à ce processus. Parmi les partenaires communs, on

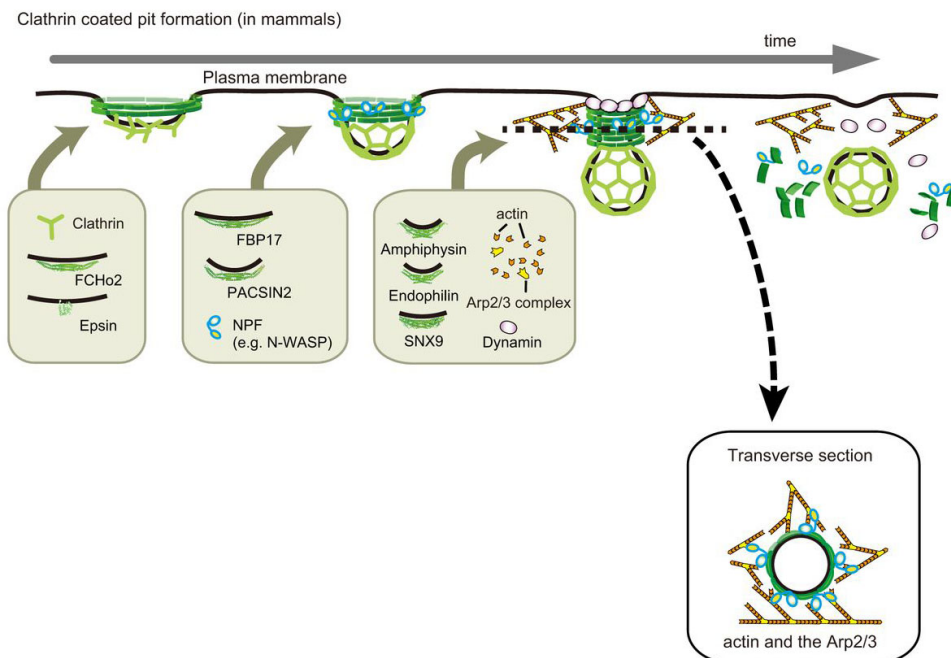


**Figure 1-10. Arbre phylogénique des protéines à domaine BAR/F-BAR (132).**

Les protéines appartenant au groupe BAR (aussi appelé N-BAR) sont indiquées en bleu tandis que celles du groupe F-BAR sont en rose (132).

retrouve différentes protéines à domaine BAR/F-BAR impliquées dans la courbure de la membrane plasmique comme l'Endophiline, l'Amphiphysine, Pacsine et SNX9 (Figure 1-11) (71,95,97,133). L'Intersectine est une protéine d'échafaudage impliquée dans l'endocytose ayant aussi la capacité de lier la Synaptojanine et la Dynamine (115). Finalement, Grb2 est un adaptateur protéique permettant l'établissement de différentes voies de signalisation qui se lie aussi à ces deux protéines (114,131). Ces données reflètent les diverses implications des interactions SH3-PRR au sein ces processus cellulaires importants.

## 1.10. Sélection du sous-groupe de protéines à l'étude



**Figure 1-11. Rôles des protéines à domaine BAR dans l'endocytose dépendante de la clathrine (134).**

L'internalisation des vésicules fait d'abord intervenir la protéine FCHo1/2 qui ne contient pas de domaine SH3, mais plutôt un domaine de liaison à l'Epsine. Ensuite, Pacsine et FBP-17 sont recrutés et participent à la courbure de la membrane via leur domaine F-BAR. L'Endophiline, l'Amphiphysine et SNX9 participent aux stades tardifs de l'endocytose. Ces protéines contiennent aussi un domaine SH3 permettant l'interaction avec N-WASP afin d'établir un lien avec le cytosquelette d'actine (134).

La ligase de l'ubiquitine Itch, à l'instar de la Dynamine et la Synaptojanine, est aussi en mesure de lier les domaines SH3 de l'Endophiline et SNX9 grâce à sa PRR (24,51). Ces interactions, tout comme la localisation endosomale d'Itch suggèrent que la ligase puisse interagir avec d'autres protéines à domaine SH3 cheminant vers ce compartiment lors de

l'internalisation. La PRR d'Itch contient effectivement plusieurs motifs de liaison aux protéines à domaine SH3. Cette thèse a pour but d'évaluer l'étendue des liaisons établies par cette région unique à Itch parmi les ligases CWH. Sur la base de la redondance des interactions SH3-PRR observées au sein de l'endocytose, nous avons sélectionné pour notre analyse un sous-groupe de protéines comprenant l'Intersectine, l'Amphiphysine, Pacsine et Grb2. Ainsi, nous avons évalué la possibilité d'une liaison entre Itch et ces différentes protéines à domaine SH3 dans le but de comparer leurs propriétés de liaisons avec d'autres substrats connus de la ligase comme l'Endophiline et  $\beta$ -PIX décrites précédemment.

#### **1.10.1. L'amphiphysine**

L'Amphiphysine, tout comme l'Endophiline, possède un domaine BAR participant à l'endocytose. Elle interagit notamment grâce à son domaine SH3 avec la Synaptojanine et la Dynamine (135). Il existe 2 isoformes de cette protéine soit l'Amphiphysine I ainsi que l'Amphiphysine II dont 5 variantes sont créées par épissage alternatif (136). L'Amphiphysine I est exprimée principalement dans le cerveau au niveau des synapses ainsi que dans les testicules alors que l'Amphiphysine II est exprimée de façon ubiquitaire avec une concentration dans le cerveau et les muscles squelettiques (135,137). Les fonctions de ces isoformes seraient similaires. Ainsi, les souris KO pour l'Amphiphysine I présentent des anomalies dans le recyclage des vésicules synaptiques et un taux de mortalité supérieur. L'absence d'Amphiphysine I cause aussi une réduction du niveau d'Amphiphysine II dans le cerveau (138). Ces protéines sont en mesure de dimériser entre elles via leur région N-terminale et leurs rôles pourraient ainsi être reliés (139). Les souris déficientes en Amphiphysine II présentent quant à elles une mortalité périnatale associée à une cardiomyopathie. Il est intéressant de constater que l'abolition de l'expression de l'une ou

l'autre des isoformes d'Amphiphysine ne cause pas de changements morphologiques importants au niveau des synapses, malgré l'implication de ces protéines dans l'endocytose (138,140). La structure des Amphiphysines est constituée d'un domaine BAR en N-terminal, une région centrale riche en prolines, un domaine CLAP (Clathrin/AP-2-Binding) et finalement un domaine SH3. Le domaine CLAP est responsable de la liaison de l'Amphiphysine avec la clathrine et l'AP-2 lors de l'endocytose (141). L'injection de peptides correspondants à ces sites de liaison montre effectivement une inhibition du recyclage synaptique chez la lamproie (142). La PRR de l'Amphiphysine permet quant à elle son interaction avec l'Endophiline (143). Mise à part cette interaction, aucune étude n'a cependant approfondie les liaisons établies par ce domaine ainsi que leurs fonctions. On sait cependant que la PRR de l'Amphiphysine est en mesure d'interagir avec son propre domaine SH3 et que cette interaction intramoléculaire permettrait de réguler ses fonctions (144). L'Amphiphysine possède aussi, à l'instar de l'Endophiline, un domaine BAR lui permettant d'induire la courbure de la membrane plasmique. Ce domaine induit la tubulation des membranes *in vitro* (145,146). L'amphiphysine permettrait l'insertion d'une hélice amphipatique située en N-terminal de son domaine BAR (N-BAR) dans la membrane, ce qui permet d'induire sa courbure (147). De plus, ce domaine est responsable de la dimérisation des isoformes principaux de l'Amphiphysine (139). Les interactions établies par le domaine SH3 de l'Amphiphysine I/II lui permettent aussi d'accomplir ses fonctions au sein de l'endocytose, notamment via la liaison de la Dynamine et de la Synaptojanine (135). L'Amphiphysine figure donc parmi les multiples protéines à domaine SH3 interagissant avec ces protéines contenant une PRR. Il est intéressant de constater que la liaison de l'Amphiphysine avec la Dynamine permettrait aussi d'augmenter l'activité GTPase de cette dernière, responsable de la fission des

vésicules à internaliser (148). L'Amphiphysine serait aussi située à l'interface entre les processus endocytiques et l'aspect dynamique du cytosquelette d'actine. Ainsi, l'Amphiphysine I joue un rôle crucial dans la polymérisation de l'actine lors de la phagocytose (149). D'autres évidences montrent que l'Amphiphysine I est en mesure de lier directement N-WASP afin d'influencer la polymérisation de l'actine. Ces protéines colocalisent d'ailleurs au niveau des ondulations périphériques de la membrane. De plus, la polymérisation de l'actine est entravée chez les souris déficientes pour l'Amphiphysine I (150).

### **1.10.2. L'Intersectine**

Une autre protéine à domaine SH3 jouant un rôle important dans l'endocytose est l'Intersectine. Cette dernière intervient dans l'endocytose par les cavéoles de même que celle dépendante de la clathrine (151,152). Deux gènes différents codent pour les isoformes de l'Intersectine 1 et 2 chez l'humain. Ces Intersectines présentent un haut degré d'homologie en plus de montrer une architecture similaire. Ces protéines seraient aussi exprimées dans une variété de tissus et auraient une fonction similaire dans l'endocytose dépendante de la clathrine (153,154). D'ailleurs, les deux isoformes principaux de l'Intersectine co-localisent au niveau cellulaire et ont même la capacité d'interagir entre elles (155). Les gènes ITSN1 et 2 peuvent aussi être épissés de façon alternative pour générer une forme longue (Intersectine-l) ainsi qu'une forme courte (Intersectine-s). Cette dernière comporte deux domaines EH (Eps15 Homology), une région CC (Coiled-coil) et cinq domaines SH3. La forme longue est exprimée exclusivement dans le cerveau et possède en plus de ces domaines un domaine PH, DH et C2 (153). La structure particulière de l'Intersectine en fait une protéine d'échafaudage majeure permettant le recrutement d'une foule de protéines au sein de la vésicule de clathrine en formation. Elle interagit ainsi avec l'Epsine et l'Eps15 via ses domaines EH et avec la

Dynamine et la Synaptojanine via ses domaines SH3 (156-158). Ces différents partenaires interagissent à leur tour avec différentes protéines permettant collectivement l'endocytose. Les isoformes de l'Intersectine jouent un rôle dans les stades précoces de l'internalisation en recrutant l'AP-2. Elle sont elles-mêmes recrutées au niveau des vésicules en formation avec l'aide de l'Epsine et de la protéine FCHO qui initie l'internalisation des vésicules via son domaine F-BAR (159). L'Intersectine 2 aurait ainsi un rôle similaire à l'Intersectine 1, bien que ses fonctions sont moins bien caractérisées. Ces deux protéines sont impliquées dans l'endocytose et leurs surexpressions inhibent l'internalisation de la transferrine (154). Les Intersectines sont aussi en mesure de lier plusieurs partenaires communs (160). Il est intéressant de constater que les domaines SH3 de ces deux isoformes reconnaissent les mêmes protéines tandis qu'elles ne sont pas reconnues de la même façon par différentes protéines à domaine SH2 (155).

En plus de recruter diverses protéines, l'intersectine 1 permettrait aussi de faire le lien entre l'endocytose et la signalisation. Des travaux ont en effet montré un lien entre l'expression d'Intersectine 1 et l'activation de facteurs de transcription dans un mécanisme dépendant de la voie de signalisation des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) (161). L'inhibition de l'expression de l'Intersectine 1 par l'introduction successive de siRNA montre aussi un effet sur cette voie de signalisation (162). D'autres études ont permis de démontrer l'interaction entre l'Intersectine 1 et Sos (Son-of-Sevenless), une protéine permettant l'activation de Ras/Rac et leurs effets sur le cytosquelette et la polymérisation de l'actine (163,164). De plus, il existe un lien entre l'Intersectine 1 et la signalisation des récepteurs de l'EGF. Ainsi, l'Intersectine est nécessaire à l'internalisation des récepteurs activés de même qu'à l'activation de la voie de signalisation MAPK et l'activation de la transcription. Elle est

en plus associée avec Cbl, ce qui lui permet de réguler l'ubiquitylation et la dégradation des récepteurs et ainsi jouer un rôle majeur dans la signalisation (165). Cet impact proviendrait de la capacité de l'Intersectine 1 à recruter la phosphatase Shp2. Cette dernière permet de déphosphoryler Sprouty 2 et ainsi abolir son effet inhibiteur sur Cbl. Ce mécanisme augmenterait l'ubiquitylation du récepteur et son internalisation (166,167).

Un rôle supplémentaire de l'Intersectine est de faire le lien entre l'endocytose, l'exocytose et le cytosquelette. L'Intersectine 1 serait donc en mesure de réguler directement le cytosquelette en liant Cdc42 et N-WASP (168). L'Intersectine permettrait ainsi la nucléation de filaments d'actine Arp2/3-dépendante (Actin Related Protein 2/3) via l'activation de Cdc42. Cette dernière pourra alors activer N-WASP et permettre la nucléation de l'actine. N-WASP est aussi en mesure de lier directement l'Intersectine et d'augmenter son activité GEF, ce qui va permettre d'augmenter le niveau de GTP-Cdc42 et l'activation de N-WASP (168-170). L'activation de N-WASP par Cdc42 est responsable de la stimulation de l'exocytose dans des cellules neuronales permettant de faire le lien entre ce phénomène et l'Intersectine (171). De plus, l'Intersectine lie la protéine SNAP-25 (Synaptosomal-Associated Protein 25) qui est une composante majeure de l'exocytose en permettant l'arrimage de la vésicule à la membrane (172,173). Il est intéressant de constater que l'abolition de l'interaction entre l'Intersectine et Cdc42 affecte l'organisation de l'appareil de Golgi en plus d'inhiber la motilité cellulaire (174). Finalement, le rôle joué par l'Intersectine sur le cytosquelette ne se limiterait pas aux filaments d'actine puisque cette protéine lie aussi STOP, un stabilisateur des microtubules (175).



### 1.10.3. Pacsine

Trois isoformes différentes de Pacsine (Syndapine chez le rat) sont exprimées chez l'humain. Ces isoformes 1 à 3 sont respectivement exprimées dans le cerveau, de façon ubiquitaire ou encore au niveau des poumons et des tissus musculaires. La surexpression de ces isoformes inhibe l'internalisation clathrine-dépendante de la transferrine, ce qui suggère une fonction similaire de ces protéines dans l'endocytose. Ces protéines possèdent aussi la capacité d'interagir entre elles et même former des tétramères dans le cas de Pacsine 1 (133,176). Les isoformes de Pacsine sont bien conservées et possèdent une architecture similaire composée d'un domaine F-BAR en N-terminal et d'un domaine SH3 à l'extrémité C-terminale. Pacsine 1 et 2 possèdent respectivement, en plus de ces domaines, 2 et 3 motifs NPF en mesure d'interagir avec des protéines à domaine EH. Pacsine 3 ne possède pas de motif EH, mais plutôt une PRR permettant possiblement son interaction avec des domaines SH3 (133). Au niveau cellulaire, les différentes isoformes de Pacsine sont concentrés à la membrane et dans les compartiments intracellulaires. Ils colocalisent notamment avec la Dynamine (133,177,178). Le domaine F-BAR de ces protéines est responsable de la tubulation membranaire (179). De plus, les isoformes de Pacsines interagissent via leur domaine SH3 avec différentes protéines impliquées dans l'endocytose ou la régulation du cytosquelette d'actine telles que la Dynamine, la Synaptojanine et N-WASP (133,177). Parmi les différentes isoformes, Pacsine 3 est moins bien caractérisée que ses homologues Pacsine 1 et 2 qui sont impliquées dans la polymérisation de l'actine au niveau cortical et la morphogénèse neuronale (180).

Pacsine 1 est la forme majeure exprimée dans le cerveau. Le domaine SH3 de cette protéine inhibe la formation de vésicules de clathrine *in vitro* en faisant la compétition avec les

interactions établie par la forme sauvage. De la même façon, Pacsine 1 est impliquée dans l'internalisation de la transferrine (77,177). Le domaine SH3 de Pacsine 1 lie aussi la PRR de Sos avec qui elle colocalise au niveau des cônes de croissance neuronaux riches en actine. De plus, la stimulation par l'EGF permet d'augmenter l'interaction entre ces molécules (181). L'effet de Pacsine 1 sur la courbure des membranes serait aussi atténué par une liaison intramoléculaire entre son domaine BAR et son domaine SH3. La liaison de la PRR de la Dynamine au domaine SH3 de Pacsine 1 permettrait donc d'activer cette molécule et ainsi augmenter son impact sur la courbure des membranes (179,182). L'abolition de l'expression de Pacsine 1 chez la souris entraîne des crises d'épilepsie en raison d'une hyperactivité des neurones hippocampaux, un phénotype ressemblant à celui observé dans les KO pour la Dynamine. La perte de Pacsine 1 est aussi associée à une accumulation de vésicules intermédiaires, un changement de leurs tailles, ainsi que plusieurs anomalies au niveau des synapses et du recyclage synaptique (183). Il est intéressant de noter que Pacsine 1 est la seule isoforme dont le domaine SH3 est en mesure de lier l'Huntingtine. Les patients atteints de la maladie d'Huntington montrent effectivement une réduction du niveau de Pacsine 1 au niveau des synapses probablement par un effet de séquestration causé par l'Huntingtine, dont la forme mutante interagit davantage avec Pacsine 1 (184).

Pacsine 2 aurait des fonctions similaires à l'isoforme 1 avec qui elle partage plusieurs partenaires d'interaction. L'étude de cette protéine a permis d'établir un lien entre Pacsine 2 et la signalisation induite par l'EGF. Suivant leur stimulation, ces récepteurs convergent vers les endosomes où ils vont colocaliser avec Pacsine 2. De plus, l'abolition de l'expression de Pacsine 2 augmente le niveau de récepteurs présents à la surface cellulaire et en modifient l'impact sur les voies de signalisation principales établies par les MAPKs et l'AKT ainsi que

leurs effets sur la survie cellulaire (185). L'étude de Pacsine 2 a aussi permis de mieux comprendre le rôle joué par le domaine F-BAR de cette protéine. Celui-ci permettrait d'induire la formation de tubules plus minces en comparaison avec d'autres domaines similaires. Il est donc possible de penser que cette protéine soit impliquée dans les stades intermédiaires/tardifs de l'endocytose dépendante de la clathrine (186,187). Pacsine 2 intervient aussi dans l'internalisation des cavéoles qui présentent une plus grande constriction membranaire lors de leur internalisation (186,188).

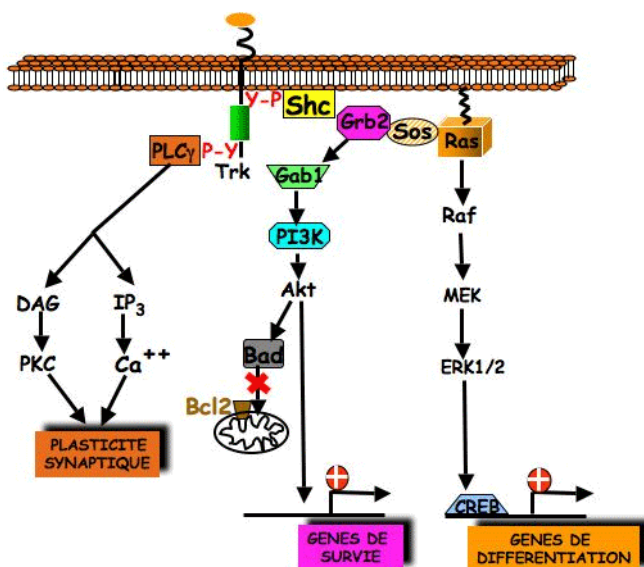
#### **1.10.4. Grb2**

Grb2 est une petite protéine très conservée entre les espèces et est formée d'une succession des domaines SH3-SH2-SH3 permettant d'accomplir différentes interactions. Comme Grb2 est dépourvue d'activité catalytique, son rôle majeur est de permettre la formation de complexes protéiques. Le domaine SH2 central de Grb2 est essentiel à cette fonction. Ce dernier permet de relier Grb2 à des résidus tyrosines phosphorylés via la séquence consensus pYXN (189). C'est d'ailleurs cette caractéristique de Grb2 qui a permis son identification chez les mammifères, lors du criblage d'une banque d'ADNc avec la portion C-terminale de l'EGFR contenant des résidus phosphorylés (190). Grb2 est ainsi en mesure d'interagir avec différents RTKs activés, des protéines d'ancrage comme Shc et FRS-2 en plus de permettre sa liaison avec des tyrosine kinases cytoplasmiques telles Bcr-Abl et FAK (191-195). Les domaines SH3 de Grb2 permettent de lier différentes protéines contenant une séquence riche en prolines. Parmi ces partenaires, on retrouve la Dynamine, la Synaptojanine, N-WASP ainsi que Cbl (114,196-198). La complexité et le nombre des interactions établies via ces domaines témoignent de leur importance dans de multiples processus cellulaires. La fonction la mieux caractérisée accomplie par les domaines SH3 de Grb2 est sans doute la

liaison de la ligase Cbl. L'activation du récepteur de l'EGF entraîne sa phosphorylation, ce qui permet la liaison de protéines reconnaissant ces motifs. La protéine Grb2 est alors recrutée et permet à son tour l'interaction avec la PRR de Cbl. Cette ligase ubiquityle le récepteur afin de permettre son internalisation par la voie dépendante de la clathrine (100). Ainsi, la déplétion de Grb2 par siRNA inhibe fortement l'endocytose clathrine-dépendante. Il est intéressant de constater que la réintroduction d'une chimère formée du domaine SH2 de Grb2 fusionné à Cbl permet de sauver le phénotype, ce qui montre l'importance de Grb2 dans le recrutement de Cbl au niveau de l'EGFR (80).

Les interactions établies par les domaines SH3 de Grb2 peuvent prendre diverses formes. Certains peptides riches en prolines ont ainsi une préférence pour l'un ou l'autre des domaines SH3 de Grb2. Certaines protéines requièrent même la participation commune des deux domaines SH3 agissant en collaboration. C'est le cas de la protéine Sos qui est reconnue par les domaines SH3 de Grb2 et qui permet de faire le lien entre l'activation de récepteurs membranaires et la signalisation par la voie des MAPKs. Les deux domaines SH3 de Grb2 sont impliqués dans cette liaison, toutefois le domaine SH3 N-terminal possède une affinité supérieure pour Sos et joue un rôle prédominant dans l'interaction (194,199). Ainsi, l'activation du récepteur de l'EGF va permettre la liaison de Grb2 sur des résidus phosphotyrosines et par le fait même le recrutement à la membrane de Sos. Cette dernière va alors être en mesure d'effectuer son rôle de GEF permettant d'activer la voie Ras/MAPK et son effet sur la différenciation (194,200). Une autre fonction importante accomplie par un SH3 de Grb2 s'effectue cette fois uniquement via son domaine C-terminal. Celui-ci interagit avec la protéine Gab1 (Grb2-Associated Protein 1) dont la phosphorylation va permettre le

recrutement de la PI3K et une augmentation de l'activation de cette voie de signalisation afin d'augmenter la survie cellulaire (201,202) (Figure 1-12).



**Figure 1-12. Signalisation induite par les RTKs impliquant Grb2 (adapté de facbio.com).**

L'activation de RTKs comme le récepteur de l'EGF permet le recrutement de Grb2 directement sur ce dernier ou via Shc. Cette liaison permet au SH3 N-terminal de Grb2 d'amener Sos au niveau de la membrane et permettre l'activation de la voie Ras/MAPK. Le recrutement de Grb2 au récepteur permet d'autre part le recrutement de Gab1 via le SH3 C-terminal de Grb2. La phosphorylation de Gab1 va alors recruter PI3K et augmenter sa signalisation (adapté de facbio.com).

## 1.11. Projet de recherche

La ligase Itch permet la régulation d'une foule de protéines en induisant leur ubiquitylation et leur dégradation. Itch interagit avec la majorité de ses substrats via ses domaines WW communs aux autres ligases de la famille CWH. Itch présente donc une

certaine redondance avec ses homologues quant à la reconnaissance des substrats. Une particularité de la ligase Itch est la présence d'une PRR bien conservée chez les vertébrés qui se situe entre son domaine C2 et les domaines WW. Cette région supplémentaire confère une certaine spécificité à Itch en lui permettant d'interagir avec des protéines à domaine SH3. Ces interactions sont uniques à Itch parmi les CWH et pourraient lui permettre d'accomplir certaines fonctions spécifiques. On ne connaît toutefois qu'une poignée de substrats interagissant avec cette région. Aussi, les préférences de liaisons de ces protéines ainsi que leurs fonctions demeurent pour la plupart inconnues. La PRR de la ligase possède plusieurs motifs de liaison pouvant potentiellement être reconnus par différentes protéines à domaine SH3. L'étude des interactions établies par la PRR d'Itch pourrait permettre de mieux comprendre comment elles s'établissent afin de prédire la liaison potentielle de nouveaux partenaires. Ces données permettraient aussi de mieux cerner les rôles joués par cette région unique parmi les ligases de type CWH.

Cette étude a donc pour but de tester la capacité de la PRR d'Itch à lier certaines protéines contenant un domaine SH3. Nous avons sélectionné un sous-groupe de protéines pour notre analyse parmi différentes molécules impliquées dans l'endocytose et la signalisation cellulaire. Ces protéines ont la capacité de reconnaître la PRR de plusieurs acteurs importants impliqués dans ces processus. La localisation de la ligase Itch au niveau des endosomes pourrait alors lui permettre un accès aux protéines internalisées et cheminant vers ce compartiment. Ainsi, la PRR d'Itch pourrait, à l'instar d'autres molécules possédant une telle région et dont la fonction endocytyque est bien caractérisée, lier différentes protéines à domaine SH3 afin d'influencer ce processus.

Dans le chapitre 2, nous allons évaluer la capacité d'Itch à lier un sous-groupe de protéines à domaine SH3 impliquées dans l'endocytose. Ces travaux nous ont permis d'identifier de nouveaux partenaires de la PRR d'Itch : l'Amphiphysine et Pacsine. Nous avons confirmé la validité de ces interactions *in vivo* par BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) et *in vitro* par pull-down en plus de les comparer à d'autres partenaires connus d'Itch. Des analyses par ITC nous ont aussi permis de déterminer l'affinité de ces complexes et leurs stoechiométries respectives. Parmi les protéines étudiées, ces analyses mettent en évidence la préférence de la PRR d'Itch envers l'Endophiline. La PRR d'Itch est aussi en mesure d'établir des complexes présentant une stoechiométrie variable. Finalement, nous avons comparé l'ubiquitylation de ces différentes protéines à domaine SH3 en présence d'Itch afin de déterminer si elles sont des substrats de la ligase. Ces résultats démontrent l'ubiquitylation de tous les partenaires SH3 d'Itch, à l'exception de  $\beta$ -PIX. Les propriétés distinctes exhibées par les différents complexes SH3-PRR démontrent que la PRR d'Itch est un module de liaison versatile pouvant accommoder plusieurs protéines à domaine SH3 avec différents impacts.

Le chapitre 3 vise à approfondir les différents mécanismes de liaison de la PRR d'Itch envers différentes protéines à domaine SH3. Nous avons débuté par l'analyse des protéines à domaine SH3 exprimées dans le cerveau et liant la PRR d'Itch. Ces analyses par spectrométrie de masse confirment que l'Endophiline est un partenaire majeur de la ligase. En plus de partenaires connus, nous avons identifié plusieurs autres protéines pouvant se lier à Itch. La PRR d'Itch est composée d'une séquence compacte de 20 acides aminés comprenant plusieurs motifs classiques de liaison aux domaines SH3. Nous avons donc cherché à mieux comprendre les bases moléculaires permettant l'interaction entre Itch et ses différents partenaires. Pour ce

faire, nous avons donc comparé les préférences de liaison du sous-groupe de protéines à l'étude dans le chapitre 2 envers la PRR d'Itch. Ces travaux ont permis de déterminer que les différentes protéines à domaine SH3 ciblent des séquences se chevauchant au sein de la PRR. De plus, l'étendue et la nature des séquences liées varie entre les différentes protéines à domaine SH3. Nous avons aussi déterminé que seules les séquences faisant partie de la PRR sont impliquées dans la liaison. Les séquences bordant la PRR ne contribueraient donc pas de façon significative dans la reconnaissance des protéines à domaine SH3. Nous avons finalement tenté de cristalliser ces différents complexes. Nous avons ainsi obtenu la structure du complexe super SH3 formé entre Itch et les domaines SH3 de  $\beta$ -PIX. Ces résultats montrent qu'une portion étendue de la PRR d'Itch peut lier simultanément chacun des domaines SH3 dans les deux orientations. En l'absence de cristaux pour les autres complexes 1 :1 formés par la PRR d'Itch, nous avons entrepris de modéliser ces interactions. Les structures obtenues nous ont permis de comparer les différentes façons dont la PRR peut se positionner par rapport au domaine SH3 afin de permettre leur interaction.

L'analyse par spectrométrie de masse réalisée dans le chapitre 3 nous a permis d'identifier un partenaire très intéressant. Il s'agit de la protéine Grb2 qui est une protéine jouant un rôle majeur dans l'endocytose et l'établissement de la signalisation cellulaire. Contrairement à la structure BAR-SH3 présentée par différents substrats d'Itch, Grb2 est composée d'une succession de modules d'interactions SH3-SH2-SH3. Les liaisons établies par Grb2 impliquent parfois l'un ou l'autre des domaines SH3 ou encore la participation commune de ces domaines. Pour toutes ces raisons, nous avons approfondie dans le chapitre 4 le lien unissant Itch à Grb2. Nous avons ainsi confirmé la validité de cette interaction *in vivo* et *in vitro*. Nous avons déterminé que les deux domaines SH3 de Grb2 sont requis pour son



interaction avec la PRR d'Itch. Nous avons aussi déterminé la stoechiométrie, l'affinité ainsi que les préférences de liaison de Grb2. Collectivement, ces analyses suggèrent qu'une courte région de la PRR d'Itch soit en mesure d'interagir simultanément avec les deux domaines SH3 de Grb2. En l'absence de données structurales pour ce complexe, nous avons modélisé cette structure. À l'instar d'autres protéines démontrant une liaison similaire, Itch pourrait donc avoir la capacité à former un complexe super SH3 avec Grb2. Finalement, nous avons déterminé qu'Itch entraînait l'ubiquitylation de Grb2. Cette étude a permis d'identifier une nouvelle modification post-traductionnelle pour cette protéine. Il est étonnant de constater que l'ubiquitylation de Grb2 n'entraîne pas sa dégradation, contrairement à d'autres substrats de la ligase. Étant donné la présence de multiples bandes correspondant à Grb2 ubiquitylé *in vivo*, nous avons procédé à des essais *in vitro* afin d'identifier qu'il s'agit bien de polyubiquitylation et le type de chaîne impliqué. De façon surprenante, ces résultats démontrent la monoubiquitylation de Grb2 *in vitro*. De plus, nos résultats suggèrent la présence d'un site principal d'ubiquitylation alors qu'un site secondaire permettrait seulement l'ubiquitylation d'une faible proportion de Grb2. Les différences observées *in vivo* et *in vitro* suggèrent l'implication d'autres facteurs pouvant influencer le patron d'ubiquitylation de Grb2. Bien que le rôle spécifique joué par cette modification reste à déterminer, nous pouvons spéculer que ce mécanisme puisse réguler les interactions établies par cet adaptateur protéique d'une façon similaire à la SUMOylation de Grb2.

## **2. Chapitre 2**

### **Liaison de multiples domaines SH3 à la région riche en prolines conservée de la ligase Itch**

**Article 1:** Multiple Src Homology 3 Binding to the Ubiquitin Ligase Itch  
Conserved Proline-Rich Region

Reprinted with permission from *Biochemistry*. Copyright (2015) *American Chemical Society*

(<http://pubs.acs.org/journal/bichaw>)

## **2.1. Mise en contexte**

Dans ce chapitre, nous avons évalué la capacité d'Itch à lier un sous-groupe de protéines impliquées dans l'endocytose. Ces travaux ont permis d'identifier de nouveaux partenaires liant spécifiquement la PRR d'Itch. Bien que nous ayons noté une interaction possible entre Itch et les domaines SH3 isolés de l'Intersectine, nous n'avons pas été en mesure d'observer son interaction avec la forme complète de la protéine. Nous nous sommes donc concentrés sur la liaison entre Itch et l'Amphiphysine et Pacsine. Des analyses par ITC nous ont permis de comparer les propriétés de liaison de nouveaux partenaires en plus de pouvoir les comparer à d'autres ligands connus tels que l'Endophiline et  $\beta$ -PIX. Ces travaux montrent une préférence marquée de la PRR d'Itch pour l'Endophiline. L'affinité mesurée pour ce complexe est comparable aux plus fortes liaisons SH3-PRR rapportées dans la littérature. Les analyses par ITC nous ont aussi permis d'observer la formation de complexes 1 :1 entre Itch et le domaine SH3 de l'Endophiline, Pacsine ou l'Amphiphysine. La stoechiométrie du complexe formé entre Itch et  $\beta$ -PIX diffère des autres ligands analysés. Ce complexe impliquerait la liaison de deux domaines SH3 de façon simultanée sur une même région de la PRR. Finalement, nous avons analysé la capacité d'Itch à ubiquityler ces différentes protéines à domaine SH3. Nous avons ainsi confirmé l'ubiquitylation de l'Endophiline par Itch en plus de démontrer celle de l'Amphiphysine et Pacsine. Il est cependant étonnant de constater qu'Itch n'est pas en mesure d'ubiquityler  $\beta$ -PIX dans ces conditions. Les interactions établies par la PRR d'Itch présentent donc des propriétés variées de même que des destins différents.

Les résultats présentés dans cette section ont été publiés dans la revue *Biochemistry* en novembre 2015. J'ai effectué la collecte des données, leurs analyses et la rédaction de ce manuscrit, révisé par la suite par tous les auteurs. La conception des expériences fut réalisée conjointement avec ma directrice Annie Angers ainsi que James G. Omichinski pour les analyses par ITC. Mathieu Lussier-Price a fourni une aide indispensable à ce projet en supervisant dans la purification des protéines nécessaires aux analyses par ITC.

# **Multiple Src Homology 3 Binding to the Ubiquitin Ligase Itch Conserved Proline-Rich Region**

Guillaume Desrochers<sup>1</sup>, Mathieu Lussier-Price<sup>2</sup>, James G. Omichinski<sup>2</sup>, and Annie Angers<sup>1</sup>

Department of Biological Sciences<sup>1</sup> and

Department of Biochemistry and Molecular Medicine<sup>2</sup>

University of Montreal

Montreal, Quebec

H3C 3J7, Canada

*Biochemistry*, 2015, **54**, 7345-7354

## 2.2. Abstract

Itch is a member of the C2-WW-HECT (CWH) family of ubiquitin ligases involved in the control of inflammatory signalling pathways, several transcription factors, and sorting of surface receptors to the degradative pathway. In addition to these common domains, Itch also contains a conserved proline-rich region (PRR) allowing its interaction with Src homology 3 (SH3) domain-containing proteins. This region is composed of 20 amino acids and contains one consensus class I and three class II SH3-binding motifs. Several SH3 domain-containing partners have been shown to recognize the Itch PRR, but their binding properties have been poorly defined. Here we compare a subset of endocytic SH3 domain-containing proteins using bioluminescence resonance energy transfer, isothermal titration calorimetry, and pull-down assays. Results indicate that Endophilin is a high-affinity binding partner of Itch both *in vivo* and *in vitro*, with a calculated  $K_D$  placing this complex among the highest-affinity SH3 domain-mediated interactions reported to date. All of the SH3 domains tested here bind to Itch with a 1:1 stoichiometry, except for  $\beta$ -PIX that binds with a 2:1 stoichiometry. Together, these results indicate that Itch PRR is a versatile binding module that can accommodate several different SH3 domain-containing proteins but has a preference for Endophilin. Interestingly, the catalytic activity of Itch toward different SH3 domain-containing proteins was similar, except for  $\beta$ -PIX that was not readily ubiquitylated even though it could interact with an affinity comparable to those of other substrates tested.

## 2.3. Introduction

Protein-protein interactions are critical for the scaffolding of large signalling complexes and the establishment of protein networks required for the integration of

extracellular cues and proper cellular responses. SH3 domains are well-characterized protein interaction modules composed of ~60 amino acids that are often found in proteins associated with large macromolecular complexes, including many involved in signalling, endocytosis, and trafficking (43). Within these large complexes, SH3 domains participate in interactions with proline-rich motifs in target proteins that typically contain either a (K/R)xxPxxP (class I) or a PxxPx(K/R) (class II) sequence (43). These proline-rich motifs are also found in many proteins that regulate signalling, endocytosis, and trafficking. In addition, these proline-rich motifs often occur in series within the PRR of proteins, and this allows for the possible binding of multiple SH3 domain-containing proteins to the same protein (86,88,196,203,204).

The classic example of a protein containing multiple SH3-binding sites within a PRR is the membrane fission GTPase Dynamin. Consistent with the presence of multiple SH3-binding motifs within its PRR, Dynamin has been shown to form functional interactions with several different proteins containing SH3 domains, including Endophilin, Pacsin, Intersectin, and Amphiphysin (196,204). In the case of Dynamin, it appears that several of the partner proteins compete for the same SH3-binding site within the PRR, but others bind to distinct sites. This suggests that these partners may bind in tandem to Dynamin. Another example of a protein containing a PRR that is targeted by multiple proteins with SH3 domains is the ubiquitin E3-ligase Cbl. Known partners of Cbl include Intersectin, Endophilin,  $\beta$ -PIX, and CIN85 (86,88,203). Interestingly, Dynamin and Cbl share common binding partners. However, the exact functional significance of these partners shared by factors containing multiple SH3-binding sites within their PRR is not clearly understood.

Like Cbl, Itch is an E3 ubiquitin-ligase that contains an extended PRR with multiple SH3-binding sites. Itch belongs to the group of homologues of the E6-AP carboxyl terminus

(HECT) class of ubiquitin-ligases and more precisely to the CWH subfamily. The CWH E3 ligases are characterized by a common domain architecture consisting of an N-terminal C2 domain, two to four tandem WW domains, and a catalytic HECT domain (1). The CWH subfamily proteins generally recognize their substrates through an interaction involving one or more of their WW domains with the PPxY motifs present in the substrate (11,33). The presence of a PRR in Itch differentiates it from other CWH E3 ligases as this PRR region allows it to target substrates containing SH3 domains. Itch was first shown to bind the SH3 domain of Endophilin and target it for degradation, but subsequent studies have shown that Itch interacts with a number of other endocytic and signalling molecules containing SH3 domains, including  $\beta$ -PIX, CIN85, and SNX9 (24,51,52). Interestingly, Itch was found to target a subset of SH3 domain-containing proteins that are also targeted by other well-known endocytic PRR-containing proteins such as Dynamin and Cbl. We therefore sought to determine whether Itch was able to interact with additional SH3 domain-containing proteins through its PRR. Thus, we selected a subset of endocytic proteins, including Intersectin, Amphiphysin, and Pacsin, and evaluated their capacities to bind the PRR of Itch.

The PRR of Itch extends over 20 amino acids and contains four putative SH3-binding sites (24). Despite the fact that several SH3 domain-containing proteins were found to bind the Itch PRR, there is very little mechanistic information about how the PRR of Itch interacts with these substrates and whether Itch induces ubiquitylation of all of these proteins (51-53). Given the amino acid composition of the Itch PRR, it is possible that these various SH3 domain-containing proteins could either compete for binding to Itch or bind in tandem on adjacent sites within the PRR. In this study, we used ITC, BRET, and glutathione S-transferase (GST) pull-down assays to compare the binding properties of the PRR region of



Itch with those of four SH3 domain-containing proteins. Among these, we identified Amphiphysin and Pacsin as two new binding partners and potential substrates of Itch. We also show that despite the apparent uniformity of different protein's SH3 domain folding, there are significant differences in the complex properties, showing that binding of the Itch PRR to SH3 domain-containing proteins is not a one-size-fits-all model.

## **2.4. Experimental procedures**

### **2.4.1. Cell culture and transfection**

Human embryonic kidney 293T (HEK-293T) cells were obtained from the ATCC and were maintained at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in high-glucose DMEM (Gibco) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone), penicillin (Invitrogen, 100 units/mL), and streptomycin (Invitrogen, 100 mg/mL). Cells were transfected with the indicated plasmids using calcium/phosphate precipitates (205). Typically, cells were transfected using 5 µg of plasmid/55 cm<sup>2</sup>.

### **2.4.2. Plasmids**

Plasmids encoding rLuc-Itch, FLAG-Itch, GFP-Itch, GST-Itch, GST-Itch PRR, GST-Itch WWs, His-Myc-ubiquitin, and GFP-Endophilin A1 have all been described previously (24,29,206,207). Constructs encoding GFP fusions of Amphiphysin II SH3, Pacsin 1, Intersectin-1L full-length, and SH3 domains as well as pcDNA3-Amphiphysin II were a kind gift from P. S. McPherson (Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, QC). HA-Ubiquitin, Myc-Itch, and FLAG-β-PIX were kind gifts from T. M. Dawson (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD), G. Walz (University Hospital

Freiburg, Freiburg, Germany), and J. P. Fawcett (Dalhousie University, Halifax, NS), respectively. YFP-tagged WWP1, WWP2, and Nedd4 were obtained from P. D. Bieniasz (The Rockefeller University, New York, NY). GST and His-tagged Itch PRR were created by polymerase chain reaction (PCR) amplification of Itch cDNA subcloned in pGEX-4T1 (Amersham Biosciences) and pET15B (Novagen) vectors modified to replace the thrombin cutting site with a TEV-recognized sequence. GST constructs expressing Endophilin, Pacsin, Amphiphysin, and  $\beta$ -PIX SH3 were also obtained by PCR amplification and subcloning into the pGEX-4T1 TEV-modified vector. PCR primer sequences are listed in Table 2-1.

### **2.4.3. Antibodies**

Polyclonal antibodies against GFP were purchased from Thermo Fisher Scientific (A11122). Anti-Amphiphysin I/II monoclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (SC-58227). Antibodies raised against the GST epitope were a kind gift from P. S. McPherson (Montreal Neurological Institute, McGill University) and were described previously.<sup>18</sup> Monoclonal antibodies against the FLAG and HA epitopes were purchased from Sigma-Aldrich (F3165 and 143 H9658). Anti-Myc monoclonal antibodies were from Enzo Life Sciences (SA294-0500). Goat anti-rabbit-HRP and goat anti-mouse-HRP IgG were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (111-035-003 and 115-035-003, respectively).

### **2.4.4. BRET experiments**

HEK-293T cells were cotransfected by calcium/phosphate with fixed amounts of cDNAs encoding rLuc-Itch and increasing concentrations of GFP fusion proteins (varying from 0 to 3  $\mu$ g/9.5 cm<sup>2</sup>). Forty hours post-transfection, the cells were washed in PBS, collected

in 1 mL of Tyrode's solution, and diluted to a density of  $10^6$  cells/mL. Coelenterazine (Biotium) was added to a final concentration of 5  $\mu$ M. The total fluorescence was measured in a FlexStation apparatus (Molecular Devices). Luminescence and fluorescence were quantitated with a Mithras LB 940 apparatus (Berthold Technologies). Three measures were obtained: light emitted at  $485 \pm 20$  nm by rLuc, emission of fluorescence at  $530 \pm 25$  nm with excitation due to energy transfer from rLuc to GFP, and total emission of fluorescence at 530 nm after excitation at 485 nm to measure total expression of GFP fusion proteins. The BRET ratio was defined as (emission due to energy transfer at 530 nm) / (emission at 485 nm) – Cf, where Cf corresponds to (emission due to energy transfer at 530 nm) / (emission at 485 nm) for rLuc-fused Itch expressed alone in the same experiment. The calculated BRET signal is then plotted against the Fluorescence/Luminescence ratio that represents the cellular content of GFP and rLuc relative to each other. The Fluorescence/Luminescence is thus defined by [(total emission of fluorescence at 530 nm after excitation) – (total emission of fluorescence at 530 nm after excitation for rLuc-fused Itch expressed alone in the same experiment)] / (emission at 485 nm) (208). Results were obtained from at least three independent experiments. Transfection conditions can vary for some proteins between experiments to ensure the presence of a variety of protein expression ratios required for subsequent curve fitting. BRET ratios were plotted against the ratio of measured fluorescence and luminescence for each point. Aberrant data resulting from negligible luminescence levels (<10000 counts) or from total fluorescence levels lower than the background were omitted.

#### **2.4.5. Pull-down experiments**

Transfected HEK-293T cells were washed in PBS and resuspended in buffer A [20 mM Hepes (pH 7.4) and 150 mM NaCl] with protease inhibitors. The cells were lysed by sonication, and TritonX-100 was added to a final concentration of 1%. Extracts were incubated for 20 min at 4 °C and centrifuged at 15000 rpm and 4 °C. Extracts were incubated with 10 µg of the appropriate GST fusion protein coupled with glutathione (GSH) Sepharose 4B (BioWorld) for 16 h at 4 °C. Beads were washed extensively in the same buffer and prepared for Western blot analysis. In an effort to normalize the quantity of GST fusion proteins used in each assay, purified beads were run on a 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) gel along with a standard curve ranging from 1 to 10 µg of BSA. The gel was stained with Coomassie, and densitometry analysis allowed the determination of the volume of beads needed to obtain the desired amount of GST fusion. Bacterially expressed GST-tagged proteins used in Far Western and competition assays were eluted from beads using 5 mM GSH in a 50 mM Tris buffer (pH 8.3). Purified proteins were quantified as described above.

#### **2.4.6. Western blot and Far Western analysis**

Protein extracts and purified proteins obtained by pull-down assays were separated by SDS–PAGE on 3–12% polyacrylamide gels. Proteins were then transferred to nitrocellulose for blotting with the appropriate primary and secondary antibodies; 0.1 µg/ mL goat anti-rabbit-HRP or goat anti-mouse-HRP conjugated IgG was used (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Antibody incubation and membrane washing were performed in PBS supplemented with 5% dry milk and 0.05% Tween 20. Immunoreactivity was detected by

chemiluminescence using West-Pico SuperSignal (Thermo Fisher Scientific). For Far Western assays, extracts were run in triplicate. The first set was processed as a classical Western blot, whereas the others were incubated with 50 pmol/mL GST or GST-Itch PRR prior to being extensively washed with solution A and further revelation by Western blotting with anti-GST antibodies.

#### **2.4.7. Expression and purification of proteins**

The SH3 domains and PRR peptides were expressed as GST fusion proteins in *Escherichia coli* host strain TOPP2 (Stratagene). The cells were grown at 37 °C in Luria Broth medium, and protein expression was induced for 4 h at 30 °C with 0.7 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Inalco). The cells were harvested by centrifugation, resuspended in lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 M NaCl, 0.2 mM EDTA, and 1 mM DTT], lysed by being passed through a French press, and centrifuged at 105000g for 1 h at 4 °C. The supernatant was then collected and incubated for 1 h with GSH Sepharose 4B resin (GE Healthcare) at 4 °C. Following incubation, the resin was collected by centrifugation and washed with lysis buffer and TEV buffer (25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 125 mM NaCl, and 5 mM DTT). The GST tag was cleaved by incubation of the resin for 2 h with 100 units of TEV protease. The proteins were eluted by extensive washes in TEV buffer. The SH3 domains were further purified using Q-Sepharose High Performance (GE Healthcare). PRR peptides were further purified over a C4 reverse phase high performance liquid chromatography column (Vydac). Proteins and peptides were desalted, quantified by absorbance at 280 nm, flash-frozen, lyophilized, and kept at -80 °C until they were processed for ITC experiments or competition assays.

#### **2.4.8. Isothermal titration calorimetry studies**

ITC titrations were performed at 25 °C in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) using a MicroCal VP-ITC system. Concentrations of injected PRR peptides in the syringe and SH3 domain proteins in the cell varied from 150 to 450  $\mu$ M and from 15 to 45  $\mu$ M, respectively, maintaining a molar ratio of 10:1 between both protein peptides. Data were analyzed using MicroCal Origin, and all experiments fit the single-binding site model with a 1:1 stoichiometry. Errors in  $K_D$  values were estimated from duplicate measurements or more.

#### **2.4.9. Competition assays**

His-tagged Itch PRR was purified from bacterial using Ni/NTA agarose (QIAGEN) resin and a lysis/binding buffer (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10 mM imidazole). For the competition assays, 0.015  $\mu$ M His-PRR bound to the resin was incubated with an equal concentration of eluted GST-tagged SH3 domain along with 0, 10, 100, or 1000 times the molar concentration of a competing purified SH3 domain. The resin and SH3 domains were incubated for 16 h at 4 °C before being extensively washed with the same buffer supplemented with 20 mM imidazole. Proteins were then separated by SDS-PAGE followed by a Western blot with an anti-GST antibody for detection of the bound fraction.

## 2.5. Results

### 2.5.1. Itch interacts with endocytic SH3 domain-containing proteins *in vivo*

BRET studies allow for the assessment of potential protein–protein interactions in living cells by measuring GFP excitation from nonradiative resonance energy generated by degradation of coelenterazine by Renilla luciferase when the rLuc and GFP fusions are in the proximity ( $\leq 100$  Å). To evaluate the binding of Itch to different SH3 domain-containing proteins, HEK-293T cells were cotransfected with a constant amount of rLuc-Itch and increasing amounts of GFP fusions of various full-length SH3 domain-containing proteins or their SH3 domain alone. Cotransfection with GFP alone yielded the background-level signal depicted by a slowly ascending linear fit. Significant BRET curves are semi-logarithmic with increasing concentrations of the GFP fusion proteins, and this is observed between rLuc-Itch and each of the GFP-SH3 domain-containing proteins, with the exception of the full-length GFP-Intersectin. Results obtained in a typical experiment are shown in Figure 2-1A, and the experiments are highly reproducible (Figure 2-1B). The full-length GFP-Endophilin and its SH3 domain alone give BRET curves almost identical with those of rLuc-Itch, and this is consistent with our previous study characterizing the interaction between Itch and Endophilin.<sup>12</sup> Similar semilogarithmic BRET curves were also observed between rLuc-Itch and the isolated SH3 domains of Amphiphysin and full-length Pacsin, indicating *in vivo* interactions between these proteins. In addition, the SH3 domains of Intersectin were found to interact with Itch and displayed a BRET curve similar to those obtained with the SH3 domain

of Amphiphysin, but we did not observe a significant BRET curve with the full-length GFP-Intersectin protein (Figure 2-1A,B).

### **2.5.2. Closely related ubiquitin ligases do not recognize the endophilin SH3 domain**

Sequence analysis of the closely related CWH ligases Nedd4, WWP1, and WWP2 indicates that they all display multiple PxxP sequences (Table 2-S1). One of these motifs forms a classical class I binding site located between the first and second WW domains of WWP1. Nedd4 was postulated to contain a PRR even though it has no classical SH3-binding site (51). Moreover, Endophilin was shown to be ubiquitylated when coexpressed with Nedd4 and the activator Ndfip in HEK-293T cells, suggesting that Nedd4 interacts with Endophilin (209). We therefore compared the capacity of Nedd4, WWP1, and WWP2 to bind the Endophilin SH3 domain with that of Itch (Figure 2-2A). We transfected HEK-293T cells with YFP fusions of the ligases, and cell extracts were pulled down using GST or GST-Endophilin SH3 as a probe. The immunoblot indicates the recovery of Itch by Endophilin SH3, whereas WWP1, WWP2, and Nedd4 were not detected in the pull-down fraction (Figure 2-2A). This result shows that among the CWHs tested, only Itch is able to bind Endophilin.

### **2.5.3. Itch binds SH3 domain-containing proteins directly through its PRR**

Ligases of the CWH family usually interact with their substrates via their WW domains. These domains mediate interaction with short proline-based motifs, most often PPxY. Some substrates of Itch such as Cbl, Deltex, and tBid contain neither a PPxY motif nor an SH3 domain (39,210,211). In addition, the amino acid sequence of Itch reveals the



presence of three putative SH3-binding motifs outside the PRR, one of which is a canonical class I site located between the first and third WW domains. This motif was indeed found to mediate interaction with the SH3 domain of the protein kinase Fyn, probably through an unconventional binding mechanism (212). Interaction of Itch with SH3-domain proteins could thus be established either by Itch WW domains recognizing unknown binding sequences in the SH3 domain proteins or by the SH3 domain proteins recognizing proline-rich motifs outside the PRR.

To verify whether Itch interacts with the SH3 domain-containing proteins through its PRR, SH3 domain-containing proteins were transfected in HEK-293T cells and protein extracts were used to perform a pull-down analysis using GST fusions of full-length Itch (WT), the isolated PRR, or the WW domains. Immunoblotting against the SH3 domain proteins indicates binding to full-length Itch and PRR fusion proteins. No binding was detected with the WW domains, confirming that the SH3 domain-containing proteins analyzed all bind to the Itch PRR (Figure 2-2B).

Although there was no measured interaction in BRET assays between Itch and full-length Intersectin, a weak interaction could be observed in pull-down assays with GST-Itch WT and GST-Itch PRR (Figure 2-2). The small amount of pulled-down Intersectin confirms that the full-length protein does not interact strongly with the Itch PRR, in contrast with the isolated SH3 domains.

All proteins analyzed here participate in the formation of larger endocytic or signalling complexes. Some of these proteins also interact with each other or share a common binding partner. For example, Endophilin was shown to bind both Amphiphysin and Intersectin

(143,213). In addition to Itch, Endophilin and Intersectin also bind to the ubiquitin ligase Cbl (19,79). To determine if the binding of the analyzed SH3 domains to Itch is direct, we conducted a Far Western experiment in which the purified GST-Itch PRR was used to probe protein extracts of HEK-293T cells expressing full-length SH3 domain-containing proteins immobilized on a nitro-cellulose membrane. Binding of GST-fused PRR was detected with an anti-GST antibody. Under these conditions, Itch PRR binds to Endophilin, Amphiphysin, and Pacsin, whereas binding to Intersectin was not observed (Figure 2-3).

#### **2.5.4. The affinity of the Itch PRR for different SH3 domains varies greatly**

BRET assays identified potential protein–protein interactions between Itch and all the SH3 domain-containing proteins tested in a cellular context. To evaluate the relative affinity of the Itch PRR for these SH3 domains, we performed *in vitro* binding experiments using ITC. In these assays, the Itch PRR was injected into the purified SH3 domains of Endophilin, Pacsin, and Amphiphysin. We included  $\beta$ -PIX SH3 in these analyses given that it has been previously shown to interact with the PRR of Itch by ITC (52). Taken together, these results indicate that the SH3 domain of Endophilin displays the highest affinity for the Itch PRR with a calculated  $K_D$  of  $45.7 \pm 2.66$  nM, whereas the calculated  $K_D$  values for the SH3 domains of  $\beta$ -PIX and Pacsin were more than 10-fold higher ( $1.4 \pm 0.04$  and  $4.3 \pm 0.13$   $\mu$ M, respectively) (Figure 2-4B). In contrast, despite apparent heat dispersion upon injection of the Itch PRR into the SH3 domain of Amphiphysin, we were not able to accurately determine a  $K_D$  value for this complex. Nevertheless, with the exception of those for Amphiphysin, these results are

consistent with our previous results and strongly support a preferred binding of the Itch PRR to Endophilin.

#### **2.5.5. The Itch PRR binds a single SH3 domain at a time**

In addition to determining  $K_D$  values, ITC allows the determination of the binding stoichiometry of the complexes (Figure 2-4B). The SH3 domains of Endophilin and Pacsin both bind to the Itch PRR with a 1:1 stoichiometry, which is consistent with what is observed for the majority of SH3 domain-mediated interactions with PRRs (43,90). In contrast, we obtain a 2:1 binding stoichiometry between the SH3 domain of  $\beta$ -PIX and the PRR of Itch, which is consistent with what was previously observed (52). This atypical binding involving more than one SH3 domain on a single PRR has been termed “super SH3” (90). Our ITC data clearly support the formation of a heterotrimeric complex between the Itch PRR and two SH3 domains from two molecules of  $\beta$ -PIX (52). Thus, the Itch PRR has the ability to interact with single SH3 domains from Endophilin and Pacsin as well as simultaneously with two SH3 domains from  $\beta$ -PIX in a dimeric form.

#### **2.5.6. Endophilin and $\beta$ -PIX compete for Itch PRR binding**

According to the reported consensus binding motif of Endophilin’s SH3 (71), it is predicted that Endophilin would preferentially bind to the PSRPPRPSR sequence (residues 250–258) (GI:37537897). This sequence is located within the N-terminal half of the Itch PRR. In contrast,  $\beta$ -PIX was found to bind preferentially to the class I motif RPPPPTP (residues 258–264), raising the possibility that the Itch PRR could simultaneously accommodate both proteins. We thus conducted competition experiments by incubating His-PRR bound to Ni-

NTA agarose with an equimolar concentration of GST- $\beta$ -PIX SH3 in a solution with 0, 10, 100, or 1000 times the molar concentration of purified Endophilin SH3. We then monitored the fraction of the GST fusion bound to the His-tagged PRR by immunoblotting (Figure 2-5). Blotting of GST- $\beta$ -PIX shows that this SH3 domain is rapidly displaced with increasing concentrations of Endophilin SH3, and this indicates that Endophilin competes with  $\beta$ -PIX (Figure 2-5, bottom panel). The reciprocal experiment with GST-Endophilin SH3 yielded similar results (Figure 2-5, top panel), although purified  $\beta$ -PIX SH3 was unable to fully displace Endophilin, in agreement with their relative affinities. Taken together, these results indicate that Endophilin and  $\beta$ -PIX do not bind simultaneously to the Itch PRR.

#### **2.5.7. Ubiquitylation of SH3 domain-containing proteins by Itch**

The catalytic function of the Itch E3 ligase allows it to ubiquitylate most of its interacting partners. We have previously shown that Itch ubiquitylates Endophilin and targets it for proteasomal degradation (24,81). Itch also ubiquitylates and causes the degradation of SNX9, another SH3 domain-containing protein (51). We thus sought to determine if Itch is able to ubiquitylate Pacsin, Amphiphysin, and  $\beta$ -PIX. HEK-293T cells were transfected with ubiquitin, Itch, and a specific SH3 domain-containing protein, including Endophilin as a positive control. A fraction of the cell lysate was probed with the appropriate antibodies to confirm protein expression. The SH3 proteins were purified from the remaining extracts with GSH Sepharose beads bound to the GST-Itch PRR. Bound proteins were detected with the appropriate antibodies to show the relative amount of protein recovery as well as ubiquitylation. The GST-Itch PRR efficiently pulled down and retrieved each SH3 domain-containing protein. Blotting against epitope-tagged ubiquitin revealed Itch-dependent

ubiquitylation of Endophilin, Pacsin, and Amphiphysin. Background levels of ubiquitylation were observed when either Itch or the SH3 domain-containing protein was omitted from the transfection, which most likely can be attributed to endogenous SH3 domain proteins retrieved by the GST-PRR pull-down assay and ubiquitylation induced by endogenous Itch (Figure 2-6A–C). These experiments confirmed that Amphiphysin and Pacsin are also substrates of Itch. Interestingly, we failed to detect any ubiquitylation of  $\beta$ -PIX under these experimental conditions, suggesting that  $\beta$ -PIX might not be a substrate of Itch, or that it requires the participation of other factors (Figure 2-6D). Therefore, although binding of Itch PRR by the SH3 domain of Endophilin, Pacsin, and Amphiphysin correctly positions these substrates for the ligation of ubiquitin, it does not facilitate  $\beta$ -PIX ubiquitylation, showing that interaction with any given protein is not sufficient to trigger its ubiquitylation.

The substrate immunoblot on the pull-down fraction is shown here to assess the level of recuperation of the SH3 domain-containing proteins. Overexposure of the anti-GFP immunoblot performed on the pull-down fraction of GFP-Endophilin revealed a single and discrete ubiquitylation band (Figure 2-6A) indicating that the antisubstrate immunoblot tends to recognize mostly the unmodified protein. For Pacsin and Amphiphysin, a ubiquitylated band was not systematically detected in the pulled-down fractions with substrate antibodies, suggesting that either the modification of these substrates by Itch might be weaker than for Endophilin or the level of enrichment of these proteins in the pull-down fraction is lower (Figure 2-6B,C).

## **2.6. Discussion**

### **2.6.1. Itch interacts with multiple SH3 domain proteins**

Sequence analysis of the CWH ligases indicates that they all possess multiple PxxP motifs. However, only Itch has been shown to interact with SH3 domain-containing proteins, and the binding partners of Itch that possess SH3 domains in their sequence interact through the Itch PRR, which contains multiple canonical SH3-binding sites within a compact region of 20 amino acids. Consistent with the important functional role of the Itch PRR, this motif is very well conserved among vertebrates (1). We previously characterized an interaction between the Itch PRR and Endophilin, a BAR and SH3 domain-containing protein involved in endocytic processes (24,81). Itch was later found to interact with additional SH3 domain-containing proteins such as SNX9, SNX18,  $\beta$ -PIX, CIN85, and STAM-1 (51-53). These proteins play critical roles in endocytosis, trafficking, and signalling, implicating Itch as a potentially important regulator of these functions.

Itch and Nedd4 were both shown to be activated by the PPxY-containing protein Ndfip, which stimulates Endophilin ubiquitylation (209). However, we have been unable to identify a direct interaction between the SH3 domain of Endophilin and any other ubiquitin ligase besides Itch. These ligases could still bind additional regions of Endophilin, but it appears that the extended PRR of Itch is required to establish strong interactions with SH3 domains. Similarly, we examined the ability of Itch to interact with a subset of endocytic proteins that have been shown to have common binding partners and addressed the capacity of Itch to select these substrates *in vivo*. From all the proteins tested, Intersectin behaved differently, and we ruled out the formation of a significant interaction with Itch. Although Itch

is able to bind the isolated SH3 domains of Intersectin, we failed to observe an interaction between Itch and the full-length Intersectin protein both *in vivo* and *in vitro*. The GEF activity of Intersectin is inhibited by an intra-molecular interaction between its DH domain and a sequence located upstream. SH3 domains were initially thought to mediate autoinhibition, but the DH-binding site was later identified in the linker region between the SH3E and DH domains of Intersectin. Indeed, the intramolecular folding of Intersectin does not affect its binding to the PRR-containing protein N-WASP (214,215). Because we could measure only a weak interaction between Itch and the full-length Intersectin in pull-down experiments, Intersectin was excluded from further analysis.

### **2.6.2. The Itch PRR displays variable affinity for different SH3 domains**

BRET assays can be used to evaluate protein–protein interactions in a cellular context. Comparing the behavior of the selected SH3 domain-containing proteins in these assays indicates that Endophilin is a binding partner of Itch *in vivo*. *In vitro* ITC experiments indicate that Endophilin has the highest affinity for Itch PRR with a calculated  $K_D$  of 45.74 nM. In contrast, the affinities of the Itch PRR for the SH3 domains of  $\beta$ -PIX and Pacsin were in the micromolar range, and we were not able to calculate a  $K_D$  for the complex between Itch and Amphiphysin by ITC. The binding of Endophilin to the Itch PRR clearly seems to have an affinity much higher than that of the other proteins studied. Typically, SH3 domain-containing proteins have moderate affinities toward their ligands with dissociation constants ranging from 1 to 200  $\mu$ M, and only a handful of interactions involving PRRs and SH3 domains have been measured in the nanomolar range using ITC (43,47). Interestingly, all of these other high-

affinity interactions between PRRs and SH3 domains have involved an atypical motif binding to an SH3 domain (48,216-222). Thus, the interaction between the SH3 domain of Endophilin SH3 and the Itch PRR is in sharp contrast to these other high-affinity interactions, as the PRR of Itch contains three type II motifs and one type I consensus motif. It is not clear, at this point, why this particular pair exhibits such a strong binding affinity.

### **2.6.3. The Itch PRR binds a single SH3 domain at the time**

In addition to affinity measurements, ITC experiments allowed us to compare the stoichiometry of the complexes established by the Itch PRR. The SH3 domains of Endophilin and Pacsin bind to the Itch PRR with a 1:1 stoichiometry, which is similar to the vast majority of SH3 domain-mediated interactions (43,47). In contrast, we obtained a 2:1 stoichiometry for the SH3 domain of  $\beta$ -PIX interacting with the Itch PRR, and this is consistent with what was previously observed (52). This atypical binding is termed “super SH3” and has been observed with PRRs interacting with molecules containing more than one SH3 domain as first observed with the intramolecular binding of the NCF-1 PRR to its own SH3 domains (90). Super SH3s can also be induced by SH3 domains of different proteins binding to a single PRR. For example, the PRR of AMAP1 interacts simultaneously with two Cortactin SH3 domains (223). The PRR of Cbl-b also binds SH3 domains present in CIN85, CD2AP, or  $\beta$ PIX (86,224). The structures for these complexes indicate that these super SH3-mediated interactions occur through a similar mode of binding. Interestingly, these super SH3 domains share a signature GWW sequence located within their n-Src loop (90). Our ITC data support the formation of a heterotrimeric complex between the Itch PRR and two  $\beta$ -PIX molecules (52). Thus, the Itch PRR has the ability to form complexes with a single SH3 domain as with Endophilin and



Pacsin as well as with two distinct SH3 domains such as with  $\beta$ -PIX. The PRR of Itch is composed of 20 amino acids, including 10 proline residues and five arginine residues, and this proline-rich sequence contains several potential SH3-binding sites. Thus, it is possible that this region could serve as a scaffold for binding multiple SH3 domain-containing proteins. Similar PRR sequences are also present within large endocytic scaffolding proteins, including Dynamin and Synaptojanin. Both Dynamin and Synaptojanin contain numerous PxxP motifs that are located mainly within the C-terminal portion of the protein. Mapping of the target peptides on the Synaptojanin PRR indicates that Amphiphysin can bind to two sequences that are distinct in comparison to the preferred binding sites of Endophilin, which in turn overlaps with the binding sites of additional SH3 domain-containing proteins such as Pacsin, FISH, and Grb2 (71,114). Another example of a complex PRR comes from the analysis of SH3 domain-containing proteins that interact with Dynamin (196,204). Within these proteins, Pacsin and Endophilin were shown to form mutually exclusive complexes with Dynamin (196). In contrast, Amphiphysin and Endophilin bind simultaneously to the PRR of Dynamin *in vitro*, although similar complexes were not detected in co-immunoprecipitation assays (225). It was previously shown that an increased level of expression of  $\beta$ -PIX in HEK-293T cells led to the disruption of the Itch–CIN85 complex, suggesting a competitive binding for Itch (52). Indeed, these two SH3 domain-containing proteins were found to bind the same consensus PxxxPR sequence (86,203). Here, we excluded the possibility that the SH3 domains of  $\beta$ -PIX and Endophilin could bind simultaneously to the PRR of Itch even if their respective consensus-binding sites are nonoverlapping. These results suggest that the Itch PRR might be too short to accommodate simultaneous binding of SH3 domains at two distinct sites. A similar type of binding was recently observed for the PRR of srGAP3. In the case of srGAP3, a single PxxP

motif was part of both class I and class II SH3-binding sites and was found to mediate the interaction with several endocytic SH3 domain-containing proteins that were also found to interact with the PRR of Itch (226).

#### **2.6.4. Itch ubiquitylates proteins binding to its PRR domain**

Given the catalytic activity of Itch, we next determined if it was able to ubiquitylate these newly identified interacting molecules. We confirmed that Endophilin is ubiquitylated, and we established Itch-dependent ubiquitylation of Pacsin and Amphiphysin. The smear of ubiquitylated proteins detected by the ubiquitin immunoblot in those assays suggests that these substrates are polyubiquitylated, although multiubiquitylation cannot be ruled out. These observations are in agreement with previous results obtained for the ubiquitylation of Endophilin and SNX9 (24,51,81). Antibodies against the tag of the SH3 domain-containing proteins often failed to recognize the ubiquitylated forms in the pull-down fractions of Amphiphysin and Pacsin. This could reflect the level of interaction of these SH3 domain-containing proteins with the PRR of Itch, which would affect both the recovery in the pull-down assay and the in cell ubiquitylation reaction. Endophilin, because of its high affinity, was recovered more efficiently, and a ubiquitylated band could be readily recognized in the pull-down fraction with anti-GFP antibodies. Nevertheless, the ubiquitylation of Pacsin and Amphiphysin was observed only when Itch was overexpressed, which underlies the specificity of the reaction.

Interestingly, we were unable to detect ubiquitylation of  $\beta$ -PIX using the same experimental conditions. It was previously shown that Itch does not interact with  $\beta$ -PIX in MCF7 cells, whereas they readily form a complex in NIH-3T3 and MDA-MB-231 cells (52).

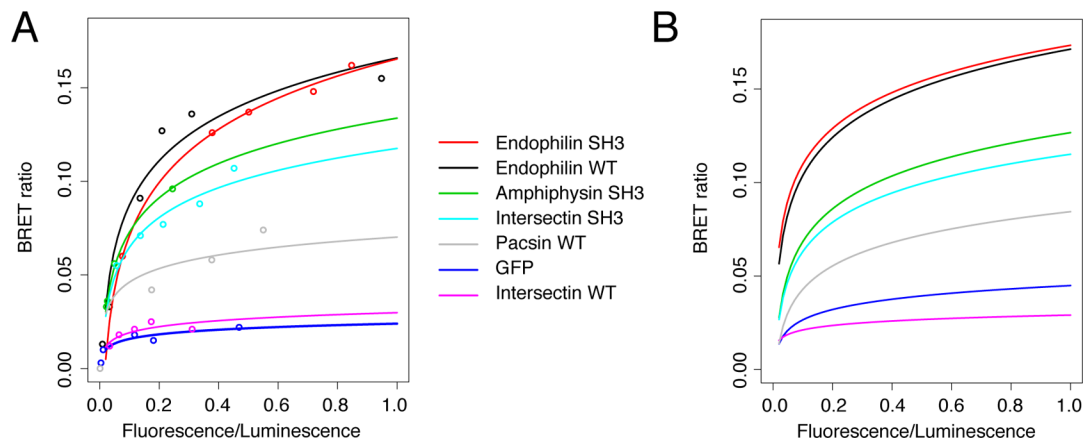
Although  $\beta$ -PIX and Itch were able to interact when overexpressed in HEK-293T cells, other factors could impact  $\beta$ -PIX ubiquitylation by Itch in these cells (52). Another possibility is that the overall conformation of the two simultaneously interacting  $\beta$ -PIX molecules might interfere with their ubiquitylation by Itch. Thus, different outcomes are possible following the interaction between Itch and its SH3 domain-containing partner.

### 2.6.5. Conclusion

The PRR of Itch displays a broad range of affinities for the SH3 domains of several of its identified partner proteins. We demonstrate that Endophilin appears to be a high-affinity binding partner both *in vivo* and *in vitro* with a  $K_D$  of 45.74 nM measured by ITC. This apparent binding affinity places the interactions of the Endophilin–Itch complex among the strongest SH3 domain-mediated interactions examined to date. The Itch PRR is also able to mediate the formation of protein complexes with different types of SH3 domains using different binding stoichiometries. Among the subset of proteins tested, only the SH3 domain of  $\beta$ -PIX was found to bind Itch with a 2:1 ratio. Nevertheless, the Itch PRR cannot simultaneously accommodate the SH3 domains of  $\beta$ -PIX and Endophilin. Interestingly, the ubiquitylation activity of Itch toward these different SH3 domain-containing proteins seems to vary in accordance with their relative affinity, as ubiquitylation of Endophilin appears to be more efficient than that of Pacsin and Amphiphysin. At this point, it is not possible to distinguish between the affinity and the catalytic capacity of Itch to ubiquitylate these substrates. On the other hand,  $\beta$ -PIX, which has an apparent  $K_D$  similar to that of Pacsin, is not a substrate of Itch. Thus, it appears that Itch-induced ubiquitylation does not depend solely on its capacity to interact with the substrates or its relative affinity. Given the fact that the most

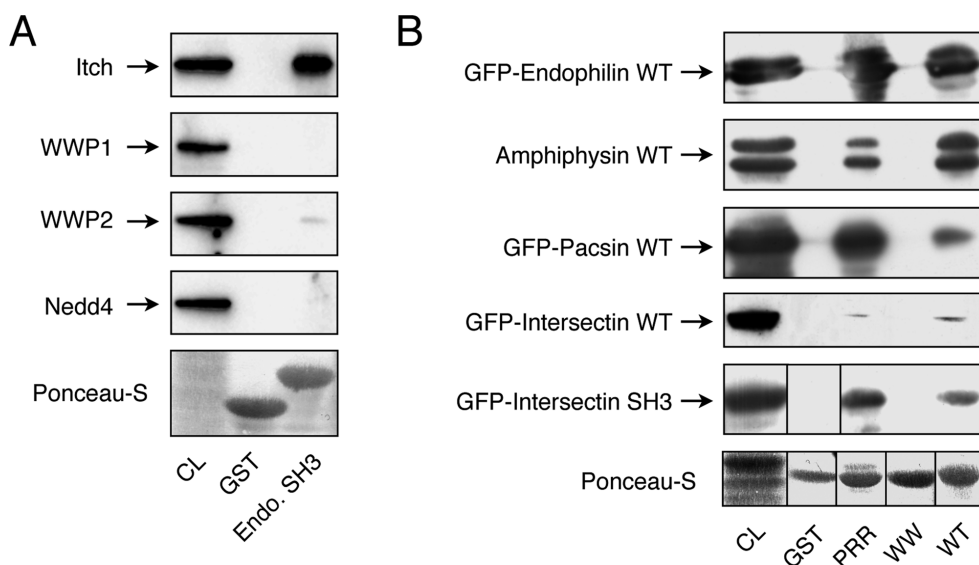
noticeable difference between  $\beta$ -PIX and the other proteins examined is the 2:1 binding stoichiometry, it is tempting to speculate that the overall conformation of the  $\beta$ -PIX–Itch complex is such that it does not allow the HECT domain to access the substrate. A more comprehensive structural analysis is required to fully elucidate these questions.

## 2.7. Figures



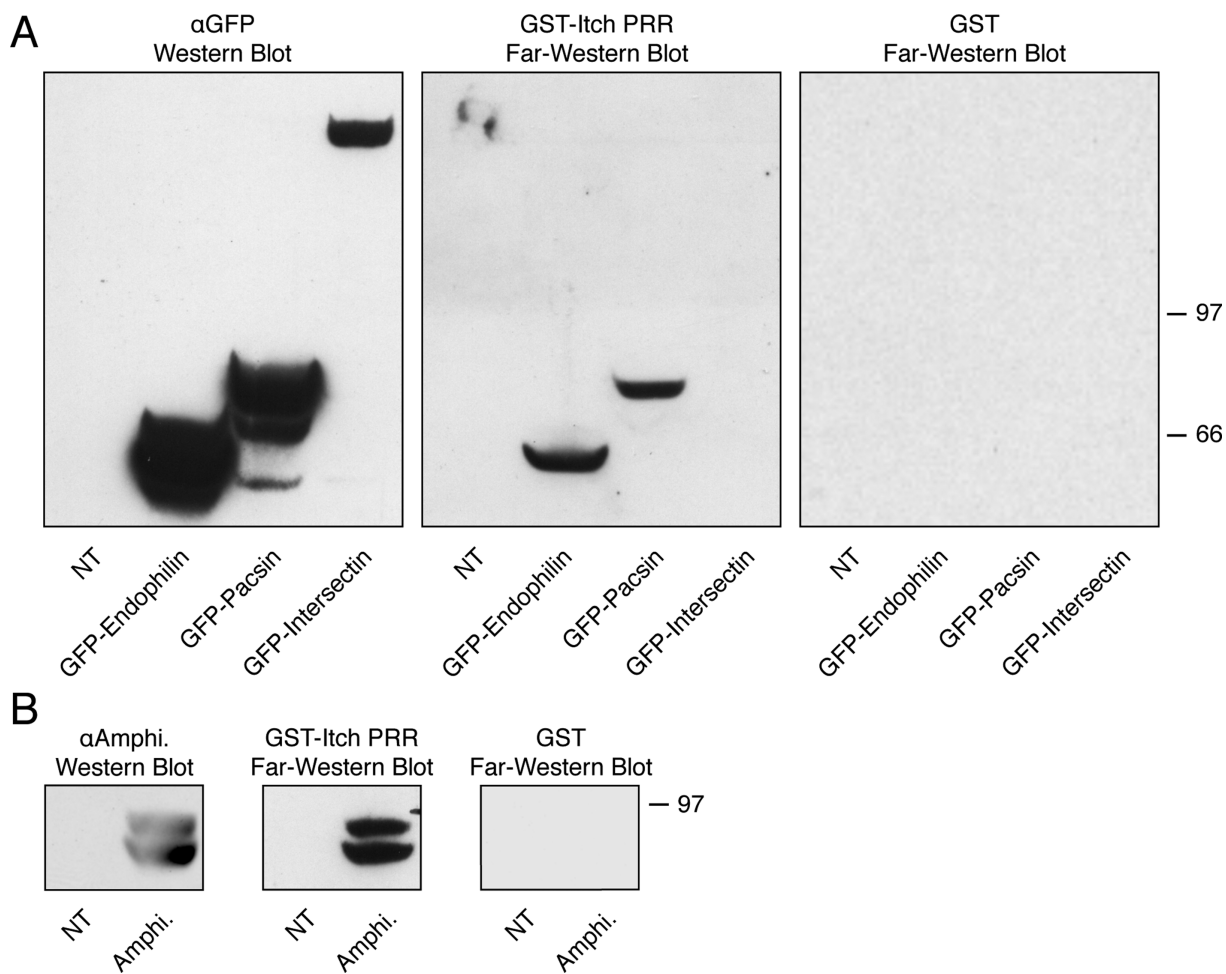
**Figure 2-1. Itch interacts with selected SH3 domain-containing proteins *in vivo*.**

(A) HEK-293T cells were cotransfected with constant amounts of rLuc-Itch and various amounts of the indicated GFP construct. The graph is a representative example of the saturation studies performed to provide evidence of a potential interaction between the proteins. BRET ratios were plotted as a function of the excited GFP activity to total rLuc activity ratio, allowing comparison between GFP-tagged proteins when they are expressed at similar levels. (B) Average results plotted as in panel A from at least three independent experiments.



**Figure 2-2. SH3 domain-containing proteins interact specifically with the Itch PRR.**

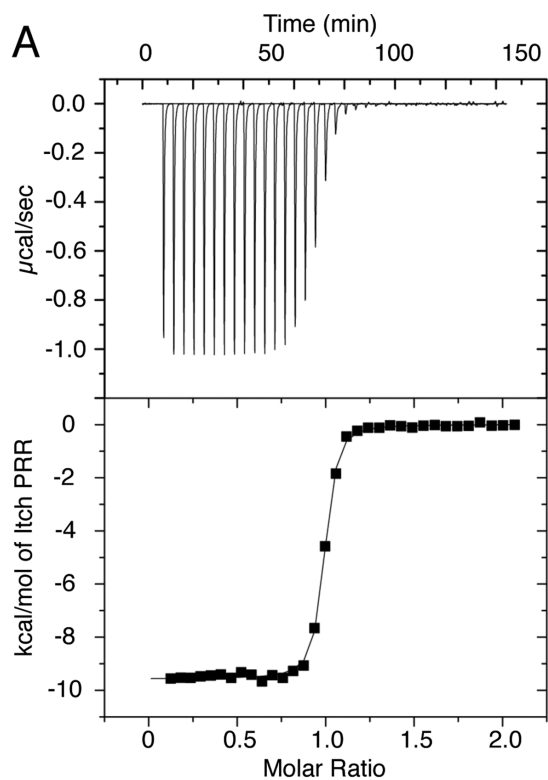
(A) HEK-293T cells were transfected with the indicated CWH ligase. The anti-GFP immunoblot was performed on 10% of cell lysates (CL) to show protein content. The remaining fraction was pulled down either with GST or with GST-Endophilin SH3 before immunoblotting. Staining with Ponceau-S reveals GST protein loading. (B) Extracts of HEK-293T cells transfected with the indicated SH3 domain-containing proteins were pulled down as in panel A with the indicated GST constructs. Immunoblotting was performed with the indicated antibodies to show recovered SH3 domain-containing proteins. The GST lane of the GFP-Intersectin SH3 blot was cropped from the end of the gel and inserted back so that the loading order was the same across the panel. Bands from Ponceau-S were cropped at a different height to show different molecular weight GST-fused proteins on a single line.



**Figure 2-3. Direct binding of the Itch PRR to SH3 domain-containing proteins.**

(A) Far Western blot analysis of protein extracts from HEK-293T cells transfected with the indicated GFP fusion with SH3 domain-containing proteins or nontransfected (NT) cells as a control. Proteins were separated by SDS-PAGE in triplicate and transferred on nitrocellulose membranes. The first set was analyzed with anti-GFP antibodies to determine protein expression levels (blot panel). The second and third sets were incubated with the GST-Itch PRR (middle panels) or GST alone (right panels) before the levels of bound fusion protein were determined with anti-GST antibodies. (B) Far Western blot analysis of protein extracts from HEK-293T cells transfected with untagged Amphiphysin or untransfected (NT) cells as a control. Extracts were processed as described for panel A, except that the first panel was blotted with anti-Amphiphysin antibodies.





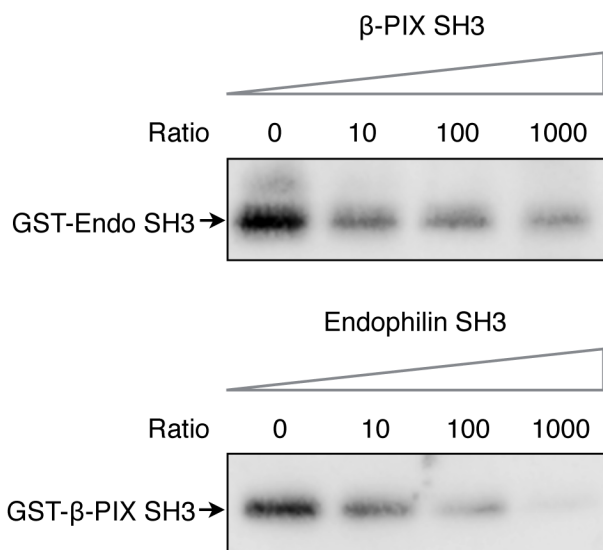
**B**

	$\Delta H$ (kcal/ mol)	$T\Delta S$ (kcal/ mol)	$\Delta G$ (kcal/ mol)	$K_D$	$n^a$
<b>Endo- philin</b>	$-9.42 \pm 0.21$	$0.59 \pm 0.17$	$-10.01 \pm 0.04$	$45.74 \pm 2.66$ nM	$0.95 \pm 0.02$
<b>Pacsin</b>	$-6.80 \pm 0.07$	$0.52 \pm 0.09$	$-7.32 \pm 0.02$	$4.33 \pm 0.13$ $\mu\text{M}$	$0.96 \pm 0.01$
<b><math>\beta</math>-PIX</b>	$-24.05 \pm 0.35$	$-16.14 \pm 0.36$	$-7.97 \pm 0.02$	$1.44 \pm 0.04$ $\mu\text{M}$	$0.49 \pm 0.02$

<sup>a</sup>Molar binding ratio of the PRR-SH3 interactions (observed stoichiometry)

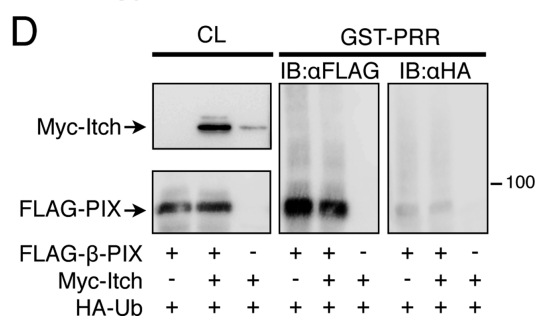
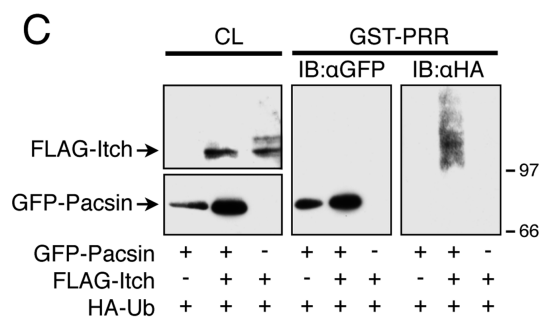
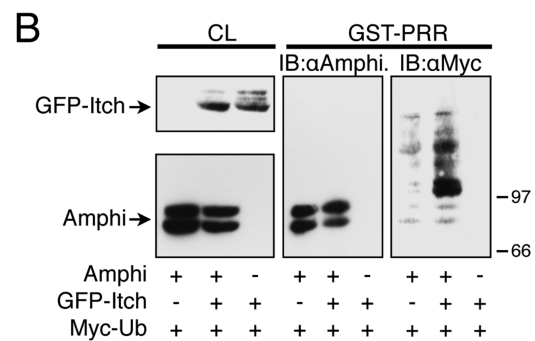
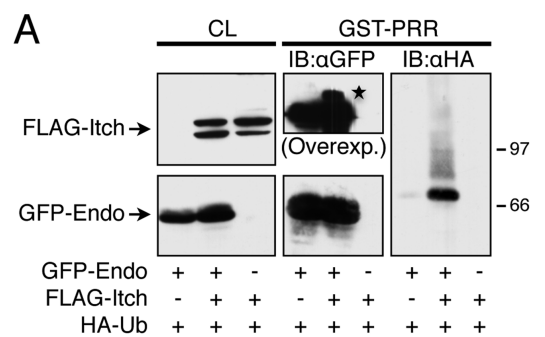
**Figure 2-4. ITC analysis of the Itch-PRR peptide (residues 224–276) binding to different SH3 domains.**

(A) Representative buffer- subtracted ITC signals for the binding of the Itch-PRR peptide to the SH3 domain of Endophilin (top) and the resulting fitted binding isotherms (bottom). (B) Thermodynamic binding parameters compiled from ITC analysis of the Itch-PRR peptide binding to the SH3 domains of Endophilin, Pacsin, and  $\beta$ -PIX.



**Figure 2-5. Itch PRR cannot accommodate two SH3 domains simultaneously.**

The His-Itch PRR bound to Ni-NTA agarose was added to an equimolar concentration of soluble GST-Endophilin SH3 (top) or GST- $\beta$ -PIX (bottom). Bound GST fusions were competed by further addition and incubation with the indicated untagged SH3 domain at 0, 10, 100, or 1000 times the concentration of the GST- tagged SH3 domains. The resin was extensively washed, and the amount of bound GST-SH3 domains was determined by Western blotting with anti-GST antibodies.



**Figure 2-6. Itch ubiquitylates Endophilin, Amphiphysin, and Pacsin.**

HEK-293T cells were transfected with a combination of ubiquitin, Itch, and a given SH3 domain-containing protein, as indicated. Transfection efficiency was confirmed by Western blotting on 10% of cell lysates (CL). The remaining fraction was pulled down using the GST-Itch PRR as a probe to retrieve SH3 proteins. Recovery of overexpressed SH3 proteins and their ubiquitylation are shown on the GST-PRR panel for (A) Endophilin, (B) Amphiphysin, (C) Pacsin, and (D)  $\beta$ -PIX. Background levels of ubiquitylation of the overexpressed SH3 domain-containing proteins were obtained by omission of Itch (first lanes), and background levels of ubiquitylated protein recovery by the GST-Itch PRR were obtained by omitting the SH3 target from the transfection assay (third lanes). The star indicates the position of the ubiquitylation band on the overexposed anti-GFP immunoblot performed on the pull-down fraction.

**Table 2-1. Primers used for amplification of subcloned sequences.**

name	sequence
Itch PRR forward	5'-GAGAGGATCCGGTGGTGGTCCTGAAGATGCAGGAGCTG-3'
Itch PRR reverse	5'-GAGAGAATTCTTAATAGGCAGATGGTGAACCATTG-3'
Endophilin SH3 forward	5'-GAGAGGATCCATGGATCAGCCCTGCTGC-3'
Endophilin SH3 reverse	5'-GAGAGAATTCCTAATGGGGCAGAGCAACC-3'
Amphiphysin SH3 forward	5'-GAGAGGATCCGGTTTCATGTTCAAGGTACAG-3'
Amphiphysin SH3 reverse	5'-GAGAGAATTCTCATGGGACCCTCTCAGTG-3'
Pacsin SH3 forward	5'-GAGAGGATCCGCCAAGGGAGTTCGTGTAC-3'
Pacsin SH3 reverse	5'-GAGAGAATTCCTATATAGCCTCAACGTAGTT-3'
$\beta$ -PIX SH3 forward	5'-GAGAGGATCCACAATCAACTGGTAGTAAGAG-3'
$\beta$ -PIX SH3 reverse	5'-GAGAGAATTCTTAGGCCTTGACCTCGCGCA-3'

Table 2-S1. PXXP motifs found in Itch, WWP1, WWP2 and Nedd4.

**K/R x x P x x P x K/R**

**Itch (NP\_001244066)**

247	G	F	K	P	S	R	P	P	R	Class II	PRR
250	P	S	R	P	P	R	P	S	R	Class II	
253	P	P	R	P	S	R	P	P	P		
256	P	S	R	P	P	P	P	T	P		
258	R	P	P	P	P	T	P	R	R	Class I and II	
261	P	P	T	P	R	R	P	A	S		
316	G	P	R	P	L	N	P	V	T		
324	T	Q	A	P	L	P	P	G	W		
356	R	P	E	P	L	P	P	G	W	Class I	
433	E	F	D	P	L	G	P	L	P		
436	P	L	G	P	L	P	P	G	W		

**WWP1 (NP\_008944)**

211	D	N	T	P	S	S	P	S	Q	
379	R	P	Q	P	L	P	P	G	W	Class I
451	E	N	D	P	Y	G	P	L	P	
454	P	Y	G	P	L	P	P	G	W	

**WWP2 (NP\_008945)**

242	A	T	D	P	E	E	P	S	V	
254	T	S	P	P	A	A	P	L	S	
272	L	P	A	P	A	T	P	A	E	
328	W	E	R	P	L	P	P	G	W	
400	D	H	D	P	L	G	P	L	P	
403	P	L	G	P	L	P	P	G	W	
441	I	Q	E	P	A	L	P	P	G	

**NEDD4 (NP\_006145)**

106	V	D	V	P	L	Y	P	L	P	
189	E	P	S	P	L	P	P	G	W	
280	Q	A	F	P	S	P	P	P	S	
335	E	E	Q	P	T	L	P	V	L	
471	D	L	G	P	L	P	P	G	W	
511	I	T	G	P	A	V	P	Y	S	

### **3. Chapitre 3**

## **Mécanismes moléculaires permettant la liaison de domaines SH3 à la région riche en prolines de la ligase Itch**

**Article 2:** Molecular basis of SH3 domain binding to the ubiquitin ligase Itch  
proline-rich region

Article en préparation



### **3.1. Mise en contexte**

Le présent chapitre vise à mieux comprendre le rôle joué par la PRR d'Itch. Dans un premier temps, nous avons analysé par spectrométrie de masse les protéines à domaine SH3 exprimées au niveau du cerveau et possédant la capacité de lier la PRR d'Itch. La forte représentation de l'Endophiline parmi les protéines identifiées confirme la préférence de la PRR d'Itch pour cette protéine identifiée au chapitre 2. Nous avons confirmé au passage la majorité des interactions SH3-PRR établies avec Itch en plus d'identifier plusieurs partenaires potentiels. Étant donné la présence de plusieurs motifs classiques de liaison aux domaines SH3, nous avons ensuite cherché à mieux comprendre les préférences de liaisons des différentes protéines à domaine SH3 envers la PRR d'Itch. Ces travaux démontrent que ces protéines reconnaissent des séquences distinctes se chevauchant au sein de la PRR. Nous avons aussi démontré que les séquences reconnues par ces différents domaines se situent exclusivement dans la PRR et ne semblent pas impliquer la participation de résidus bordant cette séquence. Nous avons finalement tenté d'obtenir des cristaux pour ces différents complexes afin d'en déduire la structure. Ces essais nous ont permis de déterminer la conformation du PRR d'Itch interagissant avec simultanément avec deux domaines SH3 de  $\beta$ -PIX. Cette structure super SH3 montre pour la première fois ce type d'interaction impliquant la PRR d'Itch. Étant donné l'absence de cristaux pour les différents complexes 1 :1 formés avec la PRR, nous avons entrepris de modéliser ces interactions. Ainsi, nous avons pu comparer la position du PRR d'Itch interagissant avec différentes protéines à domaine SH3.

Les résultats présentés dans ce chapitre seront bientôt soumis pour publication. J'ai effectué la collecte des données, leurs analyses et la rédaction de ce manuscrit, révisé par la

suite par tous les auteurs. La conception des expériences fut réalisée conjointement avec ma directrice Annie Angers ainsi que James G. Omichinski pour les analyses par ITC et la cristallographie. Laurent Cappadocia m'a supervisé dans les essais de cristallographie en plus d'effectuer les expériences de diffractions et l'analyse de la structure obtenue. Mathieu Lussier-Price a aussi fourni une aide indispensable à ce projet en me supervisant dans la purification des protéines nécessaires aux analyses par ITC.

# **Molecular basis of SH3 domain binding to the ubiquitin ligase Itch proline-rich region**

Guillaume Desrochers<sup>1</sup>, Mathieu Lussier-Price<sup>2</sup>, James G. Omichinski<sup>2</sup>, and Annie Angers<sup>1</sup>

Department of Biological Sciences<sup>1</sup> and

Department of Biochemistry and Molecular Medicine<sup>2</sup>

University of Montreal

Montreal, Quebec

H3C 3J7, Canada

Article en préparation

### **3.2. Abstract**

The ubiquitin ligase Itch plays major roles in signalling pathways by inducing ubiquitylation and degradation of several substrates. In order to accomplish these roles, Itch must first bind its substrates. Similarly to other ligases of the C2-WW-HECT family, Itch can interact with PPXY-containing proteins via its WW domains. In addition to these common domains, Itch possesses a proline-rich region (PRR) enabling its interaction with SH3 domain-containing proteins. Itch PRR indeed interact with several SH3 domain-containing proteins involved in signalling, endocytosis and trafficking. Despite their apparent surface uniformity and a conserved fold, we have previously established that these proteins display different stoichiometries and a wide range of affinities towards Itch PRR, with Endophilin showing affinities three orders of magnitude greater than any other SH3 domain tested. However, the molecular mechanisms and binding preferences underlying this wide range of binding parameters remain to be elucidated. Using a pull-down assay combined with a mass spectrometry analysis, we have determined that Itch PRR preferentially forms a complex with Endophilins, Amphyphisins and Pacsins, but can also engage a variety of other SH3 domain-containing proteins. Here, we have mapped the binding sites of the major binding partners of Itch containing an SH3 domain by pull-down, using a combination of PRR sub-sequences and mutants. We found that the proteins target distinct sequences within the Itch PRR. We further analyzed the structure of these protein complexes by crystallography and molecular modelling. These structures depict the position of Itch PRR engaged in a 2:1 protein complex with  $\beta$ -PIX and a 1:1 complex with other SH3 domain-containing proteins. Taken together, these results revealed the binding preferences of the Itch PRR towards most of its SH3 domain-containing partners.

### 3.3. Introduction

The C2-WW-HECT (CWH) family of ubiquitin ligases are involved in major signalling pathways that regulate cell growth and proliferation (11). Nedd4 and Itch are well known members of the family that regulate T cell activation and effector differentiation (14). In order to ubiquitylate their substrates, CWH ligases must first establish a direct contact with them. This is done via the interaction of their WW domains with short PPxY motifs present in the substrate. Unlike other members of the CWH family, Itch possesses a conserved proline-rich region (PRR) in the otherwise unconserved linker region between the N-terminal C2 domain and the WW domains common to the other ligases of the family. This PRR is composed of 20 amino acids and enables its interaction with SH3 domain-containing proteins (1,24).

SH3 domains are well-characterized protein-interaction modules composed of roughly 60 amino acids with a conserved fold and often found in proteins involved in signalling, endocytosis and trafficking. Itch PRR is recognized by several of these SH3 domain-containing proteins and was found to induce ubiquitylation of most of these binding-partners (Desrochers et al, *unpublished data*) (24,51-53). A noticeable exception to this rule is  $\beta$ -PIX, that was not readily ubiquitylated by the ligase in similar conditions (227).

Despite the functional characterization of some of the interactions established between Itch PRR and binding SH3 domains, little is known about the selectivity and strength of these interactions. SH3 domains' conserved fold generally exposes key aromatic residues and a proline at the surface to form the hydrophobic pockets required for interaction with a core PxxP sequence (Fig. 3-1). An additional specificity pocket defined by acidic residues in the

RT loop of the SH3 domain complete the binding motif by interacting with a charged residue outside the proline core. The relative position of this residue defines the orientation of the typical class I (+xxPxxP) and class II (PxxPx+) ligands. Itch PRR consists of a compact succession of three class II and one class I binding motifs, partially overlapping (227). Isothermal titration calorimetry (ITC) shows that Itch PRR can form classical complexes with a 1:1 protein ratio. In the same set of experiments, we have shown that Itch PRR can interact simultaneously with two SH3 domains either from different  $\beta$ -PIX molecules or from a single Grb2 protein (227) (Desrochers et al, *unpublished data*). The PRR of Itch is thus engaging in at least two different complex structures, with distinct stoichiometries. Even though SH3 domains overall structure and amino acid composition is greatly conserved, subtle variations can lead to drastic changes of the binding properties and substrate specificity. Interaction studies also demonstrated that the affinity of Itch PRR towards these SH3 domains varies greatly with a clear preference for Endophilin. Interestingly, the dissociation constant reported for the Endophilin-Itch complex places it among the strongest SH3-PRR affinities reported to date. However, the specific residues involved and the molecular basis of Itch PRR targeting to SH3 domains remain to be elucidated.

Here, we have mapped the binding sites of a subset of SH3 domain-containing proteins, and found that SH3 domains recognized distinct, yet overlapping sites within Itch PRR. We next attempted to obtain crystals of these complexes and were able to solve the full structure of the simultaneous interaction between Itch PRR and two  $\beta$ -PIX SH3s. We then used this structure as a template for molecular modelling to determine a plausible SH3-binding interface between Itch PRR and other SH3 domain-containing proteins forming classical 1:1 protein complexes. Finally, we conducted mass-spectrometry experiments to determine the

complement of SH3 proteins recognizing Itch PRR. Taken together, these results revealed the binding preferences of the Itch PRR towards most of its SH3 domain-containing partners.

### **3.4. Experimental procedures**

#### **3.4.1. Cell culture and transfection**

HEK-293T cells were obtained from the ATCC (American tissue culture collection) and were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in high glucose DMEM (Gibco) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone), penicillin (Invitrogen, 100 U/ml) and streptomycin (Invitrogen, 100 mg/ml). Cells were transfected with the indicated plasmids using calcium/phosphate precipitates (205). Typically, cells were transfected using 5 µg of plasmid/55 cm<sup>2</sup>.

#### **3.4.2. Plasmids**

Plasmids encoding Amphiphysin II, GFP-Pacsin 1 and GFP-Endophilin A1 were a kind gift from PS McPherson (Montreal Neurological Institute, McGill University). GFP and FLAG-tagged β-PIX were generously provided by A Weiss (Howard Hughes Medical Institute, University of California) and JP Fawcett (Dalhousie University). We have produced the various PRR sub-sequences by annealing the primers (Thermo Fisher) coding the indicated amino acids with an additional tyrosine to facilitate protein quantification by spectrometry and introduced this sequence in the pGEX-4T1 vector. Another GST-PRR (249-269) construct was created by insertion of the PRR coding sequence preceded by three glycines in a modified pGEX-4T1 vector where the Thrombin cutting site was replaced with a TEV-recognized sequence. This construct was used for large-scale protein purifications (for ITC and

crystallography assays) along with GST-fused constructs expressing Endophilin, Pacsin, Amphiphysin and  $\beta$ -PIX SH3. These plasmids were obtained by PCR amplification and subcloning into the pGEX-4T1 TEV modified vector as described previously (227). We have further included an annealed sequence coding three copies of the FLAG epitope in the BamHI restriction site of the TEV modified GST-PRR (249-269). The FLAG-tagged construct behaved similarly in pull-down experiments and was used to introduce point mutations to change arginines to glutamic acids in Itch PRR (228).

### **3.4.3. Antibodies**

Polyclonal antibodies against Pacsin 1 were purchased from Genetex (GTX103078). Polyclonal antibodies against pan-Endophilin or GFP tag were bought from Thermo Fisher (36-3400, A-11122). Anti-Amphiphysin I/II monoclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (SC-58227). Monoclonal antibodies against the FLAG epitopes were purchased from Sigma- Aldrich (F3165). Goat anti-rabbit-HRP or goat anti-mouse-HRP IgG were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (111-035-003, 115-035-003).

### **3.4.4. Pull-down experiments**

Transfected HEK-293T cells were washed in PBS and resuspended in buffer A (20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl) plus protease inhibitors. The cells were lysed by sonication and Triton X-100 was added to a final concentration of 1%. For rat brain extracts (Pel-Freez Biologicals), tissue was homogenized in buffer A and centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes before Triton X-100 was added to the resulting supernatant. Extracts were incubated for 20 minutes at 4°C and centrifuged at 15 000 rpm, 4°C. Extracts were incubated with 10  $\mu$ g of the appropriate GST fusion protein coupled with Glutathione (GSH) Sepharose



4B (Bio-World) for 16 hours at 4°C. Beads were washed extensively in the same buffer and prepared for Western blot analysis. In an effort to normalize the quantity of GST fusion proteins used in each assay, purified beads were run on a 10% SDS-PAGE along with a standard curve of BSA. The gel was stained with Coomassie and densitometry analysis allowed the determination of the volume of beads needed to obtain the desired amount of GST fusion.

### **3.4.5. Western blot analysis**

Protein extracts and purified proteins obtained by pull-down assays were separated by SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose for blotting with the appropriate primary and secondary antibodies. 0.1 µg /ml of goat anti-rabbit-HRP or goat anti-mouse-HRP conjugated IgG were used (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Antibody incubation and membrane washing were performed in PBS supplemented with 5% dry milk and 0.05% Tween 20. Immunoreactivity was detected by chemiluminescence using West-Pico SuperSignal (Thermo Fisher Scientific).

### **3.4.6. Expression and purification of proteins**

The SH3 domains and PRR peptides were expressed as GST-fusion proteins in *E. coli* host strain TOPP2 (Stratagene). The cells were grown at 37°C in Luria Broth media, and protein expression was induced for 4 hours at 30°C with 0.7 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Inalco). The cells were harvested by centrifugation, resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 M NaCl, 0.2 mM EDTA, and 1 mM DTT), lysed by being passed through a French press and centrifuged at 105 000 g for 1 hour at 4°C. The supernatant was then collected and incubated for 1 hour with GSH Sepharose 4B resin (GE

Healthcare) at 4°C. Following incubation, the resin was collected by centrifugation and washed with lysis buffer and TEV buffer (25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 125 mM NaCl, and 5 mM DTT). The GST tag was cleaved by incubating the resin for 2 hours with 100 units of TEV protease. The proteins were eluted by extensive washes in TEV buffer. The SH3 domains were further purified using Q-Sepharose High Performance (GE Healthcare). PRR peptides were further purified over a C<sub>4</sub>-reverse phase HPLC column (Vydac). Proteins and peptides were desalted, quantified by absorbance at 280 nm, flash frozen, lyophilized, and kept at -80°C until being processed for ITC experiments and crystallography.

#### **3.4.7. Isothermal titration calorimetry studies**

ITC titrations were performed at 25°C in 20 mM phosphate buffer at pH 7.4 using a MicroCal VP-ITC system. Concentrations of injected PRR peptides in the syringe and SH3 domain proteins in the cell varied respectively from 150 to 350 µM and from 15 to 35 µM, keeping a molar ratio of 10:1 between both protein peptides. Data were analyzed using MicroCal Origin Software and all experiments fit the single binding site model with a 1:1 stoichiometry. Errors in K<sub>D</sub> values were estimated from duplicate measurements.

#### **3.4.8. Mass spectrometry**

GST pull-down with rat brain extracts (Pel-Freez Biologicals) were performed with either GST alone, GST-PRR (224-276) or GST-FLAG-PRR (249-269). Fusion proteins alone were loaded aside the bound fractions as a control and proteins were separated by SDS-PAGE. The resulting gels were stained with Imperial protein stain (Thermo Fisher) and gel sections corresponding to proteins above or below GST-fusion proteins (upper or lower gels) were processed with in-gel tryptic digest and subsequent nanoLC-MS/MS analysis by the

proteomic platform of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC). Data analysis was performed using the Global Proteome Machine to display SH3 domain-containing proteins identified in the screening (229,230).

### **3.4.9. Crystallography**

Lyophilized PRR peptide and  $\beta$ -PIX SH3 domain were suspended in water at a final concentration of 4.8 and 4 mM and mixed to a final 1.7:1 molar ratio. Crystals were obtained at 20°C using the vapour diffusion method with a hanging drop containing an equal volume of protein complex and well solution (100 mM MIB buffer pH 5.0 and 25% PEG1500). Crystals were mounted in a loop and flashed-cooled in a stream of nitrogen gas at 100K. Diffraction data were collected using a Pilatus 6M detector at beamline X25 at the National Synchrotron Light Source of the Brookhaven National Laboratory. Datasets were indexed and integrated using XDS and scaled with Scala (CCP4). Molecular replacement was performed with Phenix using the crystal structure of AIP4 and  $\beta$ -PIX (pdb 2P4R) as a search template. Model building was performed in Coot and refinement in Phenix.

### **3.4.10. Modelling**

We used as a template the structure of the PRR of Itch in complex with SH3' in our crystal structure that depicts a canonical class II interaction that involves the participation of prolines 259 and 262. Another copy of the peptide was then oriented to this complex. We have aligned the proline residues 253 and 256 to the prolines creating the class II motif in the PRR- $\beta$ -PIX complex. We have then replaced the SH3 domain of  $\beta$ -PIX by the SH3 domain of Endophilin (extracted from the pdb structure 3IQI) and erased the original PRR- $\beta$ -PIX to obtain a chimeric PRR-Endophilin complex. We used the same approach for Pacsin

(pdb:2X3X) and Amphiphysin (pdb:1BB9), with the exception that the prolines 250 and 253 were instead aligned to the class II motif of the PRR- $\beta$ -PIX complex in agreement with the results obtained in the pull-down analysis. The resulting chimeric structures were then used as a template for the high-resolution modelling protocol FlexPepDock, implemented with the Rosetta framework. This protocol was proven to be highly efficient in a benchmark for modelling protein complexes (231,232). FlexPepDock produced 300 low resolution and 300 high-resolution structures. The resulting models had a peptide backbone r.m.s.d. that ranges from 2.5 to 4Å compared to the initial chimeric structure, showing that the flexible docking procedure was not only exploring local minima. The representation of the best model according to FlexPepDock score was done with PyMol (Schrödinger). For Pacsin and Amphiphysin, we selected the third models for representation. Residues establishing a hydrogen bond or a hydrophobic contact were identified using LigPlot+ (233,234). The surface hydrophobicity color script used for representation was generously provided by HA Steinberg (Artforscience) that derived from a scale by SD Black and DR Mould.

### **3.5. Results**

#### **3.5.1. SH3 domain-containing proteins binding to Itch PRR**

Itch PRR displays a variety of potential binding sites. To further evaluate the capacity of Itch PRR to interact with SH3 domain-containing proteins, we performed a pull-down assay with PRR peptides on rat brain extracts combined with mass-spectrometry analysis. The results are presented in Table 3-1. Most of the known binding partners for Itch PRR were identified in these fractions, except for  $\beta$ -PIX, CIN85 and STAM-1 (52,53). Almost all isoform of Endophilin, Pacsin and Amphiphysin were found in the pull-down fraction. In

agreement with its high affinity for Itch PRR and its abundance in rat brain, the vast majority of spectra identified by MS/MS were matched to Endophilin A1. Most of the other proteins detected by mass spectrometry were only represented by a limited number of spectra. Nonetheless, we find among these proteins several well-known binding partners for Itch PRR, including all those used in this study, and a few previously unknown binding partners. These include Spectrin alpha, Src, Cortactin, LASP1, DBNL, CD2AP and STAC. With the exception of Spectrin Alpha, all these new SH3 domain-containing proteins were represented by only one or two spectra.

### **3.5.2. Molecular dissection of Itch PRR-mediated interactions**

We previously showed that the PRR of Itch can accommodate different SH3 but seems to bind only one at a time (227). To determine if different SH3 domain-containing proteins had different motif preference inside Itch PRR, we constructed a series of overlapping peptides covering the complete Itch PRR in fusion with GST (Fig. 3-2A). These fusion proteins were used in a pull-down assay against the SH3 domains of Endophilin, Pacsin, Amphiphysin and  $\beta$ -PIX from rat brain extracts (Fig. 3-2B, top) or from transfected HEK-293T cells (Fig. 3-2B, bottom). In these experiments, the anti-Endophilin immunoblots revealed that this protein strongly interacts with the sequence located within the first half of Itch PRR that contains two overlapping class II SH3-binding sites (249-259). Endophilin was found to bind peptides containing a minimal RPPRPSR motif (residues 252-258). Removing the first residues of this motif, interrupting the first Class II motif (peptide 255-264) partially impaired binding to Endophilin. Interestingly, the class I and the most C-terminal class II motifs did not bind to Endophilin SH3 (257-266).

Using the same pull-down approach, we next evaluated Amphiphysin binding to the PRR of Itch. The anti-Amphiphysin antibody used in these assays recognized Amphiphysin I and II in rat brain tissues and revealed that Amphiphysin II was pulled-down more efficiently than Amphiphysin I relative to their respective expression. Despite this difference, both isoforms shared similar binding preferences. Like Endophilin, Amphiphysins bind exclusively to sequences encompassing the first half of Itch PRR with the two overlapping class II motifs (249-259). But unlike Endophilin, Amphiphysin binding did not tolerate any truncation of these class II motifs as binding was completely lost with peptides truncating either the N or C-terminal residues (peptides 255-264 and 252-266) (Fig. 3-2B). Thus while a single intact class II motif could at least partially pull-down Endophilin, both motifs had to be intact to allow interaction with Amphiphysin.

The determination of Pacsin binding site was more difficult because of its lower recuperation by pull-down using PRR subsequences. Although the longer 224-276 construct pulled-down a fair amount of overexpressed Pacsin compared to cell lysate, smaller sequences only retrieved a small amount of the SH3 domain-containing protein, even without any disturbance of the PRR (compare peptides 224-276 to 249-269) (Fig. 3-2B). With overexpression, Pacsin binding could be better detected, showing a binding pattern very similar to Endophilin and Amphiphysin, as the three proteins bind to constructs containing the first two class II motifs (249-259). Like Amphiphysin, Pacsin binding was disrupted by the truncation of any of the two class II motifs, but could still be detected in the pull-down fraction with peptide 252-266 indicating that the second class II motif contributed more to the interaction.

The binding site for  $\beta$ -PIX is more extended than the other substrates tested. The immunoblot performed against overexpressed  $\beta$ -PIX indicates a strong recuperation by peptides 252-266 but not with any other PRR truncations suggesting that this SH3 domain recognizes the class I possibly extended by the class II motifs flanking it in the Itch PRR (Fig. 3-2B). This result is consistent with previous experiments and demonstrates that  $\beta$ -PIX interaction with Itch involves a different binding scheme.

To further evaluate the binding preferences of the tested SH3 domains, we mutated R residues to Es in the GST-FLAG-fused PRR of Itch (residues 249-269) and performed pull-down analysis on rat brain extracts (Fig. 3-2C). In agreement with results obtained with PRR subsequences, the mutation analysis indicates that the first three Rs contained in the two overlapping class II motifs of the PRR mediate most of the binding with the four SH3 domains tested here. Interestingly, there were differences in the contribution of each of the first three Rs to the binding of the different SH3s. Whereas mutation of R252 abolished the interaction with all the SH3 tested, R255 mutants retained partial binding capacity towards Endophilin-A1 and  $\beta$ -PIX, and seemed to bind to Pacsin with equal efficiency as the WT sequence. R255 though was required for the interaction of Itch PRR with Amphiphysin and Endophilin A2 SH3s. In turn, mutation of R258 only partially impaired binding of Endophilin A1, but completely abolished the interaction with Endophilin A2, Pacsin,  $\beta$ -PIX, and Amphiphysin I and II. Mutation of R265 and R266 had no impact on any SH3, except when mutated together, which slightly impaired binding to Endophilin A1 and A2. Together, these results indicate that despite the fact that the preferred binding sites of these SH3 domain-containing proteins are largely overlapping, they still target distinct residues within the same sequence.

### **3.5.3. Residues located outside the proline-rich core do not contribute to the binding of SH3 domain-containing proteins**

The pull-down experiment shown in Fig. 2-2B suggests that the SH3 domain of Pacsin does not fully recognize the shorter 249-269 peptide, suggesting that residues outside of this region might contribute to the binding of Pacsin to Itch PRR. We had previously reported that Pacsin binding to Itch PRR displayed a dissociation constant comparable to that of  $\beta$ -PIX, but much lower than that of Endophilin. We thus wondered if residues located outside the proline-rich core could contribute to the binding of SH3 domain-containing proteins. To verify this, we repeated the ITC experiments with a shorter peptide (249-269) to compare the binding affinity with that of peptide 224-276 used previously (227). Representative thermograms for the SH3 domain of Endophilin, Pacsin, B-PIX and Amphiphysin are presented in Figure 3 A-D. Curve fitting to the thermograms obtained with peptide 249-269 show binding parameters highly similar to those obtained with the longer peptide (Fig. 3-3E). The binding prerequisites of SH3 domains thus rely entirely within the core PRR sequence for Endophilin, Pacsin and  $\beta$ -PIX. As reported previously, it was not possible to fit a saturation curve on thermograms obtained with Amphiphysin, although significant heat dispersion occurred.

### **3.5.4. Crystal structure of the super SH3 complex formed between $\beta$ -PIX and Itch PRR**

We have determined that different SH3 domain-containing proteins can target various overlapping sequences within Itch PRR. To further transpose these variations at the molecular level, we attempted to crystallize the protein complexes formed by the Itch PRR (249-269) and the SH3 domains of Endophilin, Amphiphysin, Pacsin and  $\beta$ -PIX. Crystals were only obtained for the Itch PRR and  $\beta$ -PIX SH3 complex. These crystals contained four copies of the



$\beta$ -PIX SH3 domain and two copies of the Itch PRR (Table 3-2). The crystal symmetry revealed two nearly identical super SH3 complexes. The complex contained in the primitive cell depicts a single PRR molecule contacting simultaneously two SH3 domains. For ease of discussion, we have labelled the upper SH3 domain SH3' and the lower one SH3'' (Fig. 3-4A). Itch PRR interacts as a class I ligand towards SH3'' (residues 259-264), as previously reported in the 2P4R structure (52). The PRR of Itch makes extensive contact with the SH3'' domain. Tandem RP (residues 252-253 and 255-256) located upstream the consensus-binding site interact with an additional face of the SH3'' domain. The binding site for SH3'' is thus located within amino acids 252-264 of Itch PRR (Fig. 3-4B). The crystal model further revealed the position of the SH3' domain in the super SH3 structure, mirroring SH3'' and thus contacting the PRR in the opposite orientation. SH3' interacts with prolines 259 and 262 docked as a class II ligand, but lacking the classical interaction between a charged residue and the specificity pocket. Instead, the R265 is positioned one residue farther and contacts an acidic residue on the additional face of the SH3' domain. An arginine residue (R258) preceding the PxxP motif completes the interaction with the SH3' domain. The SH3' binding site thus resides within residues 258-264 of Itch PRR (Fig. 3-4C). The overall super SH3 structure is further stabilized by interactions established exclusively between the RT loops of the SH3 domains that face each other. Residues 16-21 of both SH3s established water-mediated bonds and one hydrophobic contact.

Several attempts were made to obtain crystals with the other SH3s, using for example different concentrations and peptide ratios. We can only speculate at this time that the specific stoichiometry of the  $\beta$ -PIX complex somewhat favours the crystal formation for the  $\beta$ -PIX/Itch PRR complex.

### **3.5.5. Modelling of Itch PRR interaction with SH3 domains**

Since we were unable to obtain crystals of the Itch PRR in complex with Endophilin, Pacsin or Amphiphysin SH3s, we used modeling to analyse these interactions. We used the Flexpepdock protocol implemented with Rosetta (231,232). The models obtained depict a plausible structure for Itch PRR in complex with each of these SH3 domains according to the binding preferences we have determined in pull-down experiments (Fig. 3-5). Endophilin SH3 would thus interact with the core prolines 253 and 256 whereas Pacsin and Amphiphysin would target prolines 250 and 253. These complexes all involved some participation of the first three arginines of Itch PRR contacting the main SH3 binding surface. According to these models and the pull-down assays, Endophilin SH3 was the only domain targeting the first canonical class II binding site whereas Pacsin and Amphiphysin bound to the second (Fig. 3-5). Depending on its position and orientation, the PRR of Itch can thus accommodate SH3 domains in a variety of conformations to form distinct but similar molecular complexes.

## **3.6. Discussion**

Proline-rich regions often consist of a succession of potential SH3-binding sites within a sequence that can cover over a hundred residues. These binding modules enable the interaction with SH3 domain-containing proteins often found in large protein complexes established during endocytosis and cell signalling. The endocytic proteins Dynamin and Synaptojanin exemplify such complex PRRs. Mapping of their SH3 binding sequences revealed that some substrates interact with overlapping motifs whereas other were found to bind distinct sites separated by dozens of residues. The ubiquitin ligase Itch share some of the SH3-binding partners identified for Dynamin and Synaptojanin including Endophilin, Pacsin, Amphiphysin and Grb2 (71,114,196,204). Despite this similarity, the PRR of Itch consists of a

compact 21 amino acids sequence encoding three class II and one class I SH3-binding motifs. A similar PRR organization can be found in the srGAP3 protein that contains a short peptide encoding an overlapping class I and II SH3 binding-sites. A single PxxP motif within the peptide was sufficient for the interaction with several of the above-mentioned SH3 domain-containing proteins (226). Interestingly, the major binding partners of SrGap identified by mass spectrometry were also shown to bind Itch PRR even though the specific nature of their PRR differs considerably. ITC analysis further revealed that these substrates overall displayed weaker affinities toward srGAP3 than what is found here for Itch PRR (226,227). In addition to residues forming the canonical SH3 binding sites, surrounding amino acids are thus important to create additional interactions with the surface of these SH3 domains and thereby confer substrate specificity among PRRs and their ability to form high affinity complexes.

We have mapped the binding preferences of several SH3 partners of Itch by pull-down using a combination of PRR peptides and arginine mutations. Our results demonstrate that these proteins bound to distinct, yet overlapping sequences within the PRR of Itch. This is consistent with previous results indicating the formation of mutually exclusive complexes between the PRR of Itch and Endophilin or  $\beta$ -PIX SH3s. Interestingly,  $\beta$ -PIX required an extended sequence compared to other binding partners that could reflect the distinct 2:1 stoichiometry of this specific complex. According to our structure, the SH3' targets residues 258-265 presenting a class II-based atypical motif (RPxxPxxR). The SH3'' binds to same region of Itch PRR as a class I consensus (259-264). Tandem RP residues (252-253 and 255-256) complete the interaction with an additional face of the SH3 domain.

We have previously characterized the interaction between Itch PRR and these SH3 domain-containing proteins. However, we have used a longer sequence (224-276) whereas the

PRR is restricted to residues 249-269 (24,227). A recent study of Grb2 interactions with Sos and Cbl suggest that the proline-rich sequences are no crucial as initially thought. Instead, these interactions were mainly established with residues located outside the proline-rich core (235). To determine the contribution of these residues for the interaction between Itch and our subset of SH3, we conducted similar ITC experiment with the strict PRR peptide (249-269). These interactions yielded similar results. Thus, residues located directly before or after the PRR would not significantly participate in the complex formation within our subset of SH3 domain-containing proteins. The striking  $K_D$  calculated for the Endophilin-Itch PRR also suggests it could be maximal.

The discrepancy observed in the pull-down could be attributable to small variations in the GST loading. Other phenomenon could also be involved as the study of another SH3-PRR complex even exhibited a stronger affinity for a shorter peptide compared to a longer encompassing sequence (219). Nevertheless, we were able to confirm the binding preferences of  $\beta$ -PIX and determined those of Endophilin, Amphiphysin and Pacsin (227).

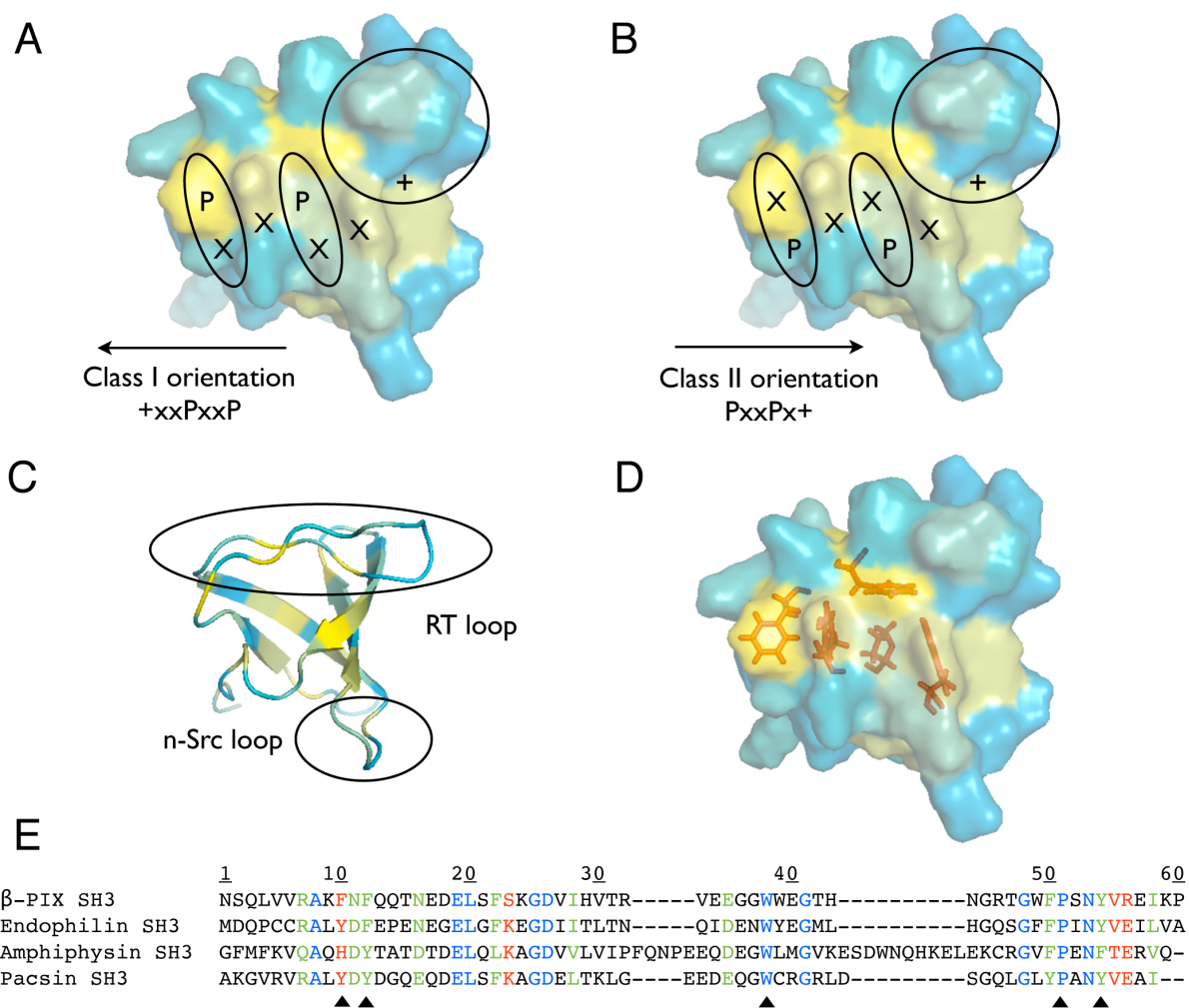
Structure of the super SH3 complex formed by the simultaneous binding of  $\beta$ -PIX SH3s to the PRR of Itch revealed interactions with a core symmetrical RPxPPxPR motif (258-265). Residues preceding or following this motif were further involved in stabilization of the complex by contacting an additional face of these SH3 domains. CIN85 and  $\beta$ -PIX have also been previously shown to form 2:1 protein complexes with a similar pseudo-symmetrical proline-arginine motif within the PRR of Cbl (86,224). These proteins and others shared a common binding mechanism involving a central positively charged residue contacting simultaneously both SH3 domains (86,224).

A central charged residue is absent from the PRR of Itch in complex with  $\beta$ -PIX molecules. Other super SH3 interactions lacking such motif were also observed for other proteins, demonstrating the versatility exhibited by such complexes (90,223). The molecular determinants that drive the formation of super SH3 complexes remain poorly understood, but it appears that the nature of the PRR somewhat contributes to these unusual stoichiometries. On the other hand, specific residues of the SH3 domain also participate in the formation of these complexes. It has been postulated that a GWW motif within the n-Src loop of the SH3 was crucial to form the binding interface. Such motif is indeed found in  $\beta$ -PIX and other SH3 domain-containing proteins behaving as super SH3. Interestingly, this motif is not always involved in SH3-SH3 interactions (86,90,223,224).  $\beta$ -PIX was also found to be able to form 1:1 protein complexes with PAK whereas it was found to interact at a 2:1 stoichiometry towards Cbl and Itch (52,84,86,227). The crystal structure presented here depicts contacts exclusively between the RT loops of both SH3 domains. Super SH3 interactions are thus complex and would rely on a combination of specific residues of the SH3 domain as well as the PRR.

The crystal structure of Itch PRR and  $\beta$ -PIX SH3” further revealed similarities with another PRR-SH3 complex. This interaction was noted between the *E. coli* secreted protein EspFu and the SH3 domain of the insulin receptor tyrosine kinase substrate (IRTKS) involved in actin assembly (48). Recognition of the PRR by the SH3 domain required the binding of two PxxP motifs in tandem with an extensive surface of interaction. The PRR of Itch exhibits a similar “L” shape exposing tandem PxxP motifs on two faces of the SH3 domain. Unlike IRTKS,  $\beta$ -PIX SH3” lacks the hydrophobic pocket that could accommodate the fourth proline. This would account for the great discrepancy observed in the respective affinity of these

complexes, as IP residues within EspFu were found to mediate a high affinity binding towards this pocket with a reported  $K_D$  of 500 nM. In comparison, the PRR of Itch interacted as an extended class I ligand that only has an affinity of 1.59  $\mu$ M towards  $\beta$ -PIX. Despite the fact that Itch PRR made extensive hydrophobic contacts, salt bridges and hydrogen bonds with both of  $\beta$ -PIX SH3 domains, its affinity is still similar to the majority of PRR-SH3 complexes. Among the SH3 domain-containing proteins tested, only Endophilin was able to establish a high affinity interaction with the PRR of Itch. The structures obtained by modelling this complex along with Pacsin and Amphiphysin exemplifies the binding preferences determined in our pull-down assay. These results thus represent a plausible conformation of the peptide contacting the main face of the SH3 domains. Intriguingly, Endophilin was the only protein targeting the first PxxP motif and such binding would place the turn of the “L” shaped peptide in a proper conformation that could allow another face of the SH3 domain to contact the peptide. In absence of crystallographic data for the complex formed between Itch and Endophilin SH3, we can only speculate that extensive rearrangements of a longer PRR sequence and/or SH3 domain could favour a perfect fit with the SH3 domain of Endophilin. This complex is thus among the strongest SH3-PRR interactions reported so far, yet the precise molecular mechanisms underlying such specificity remain unclear.

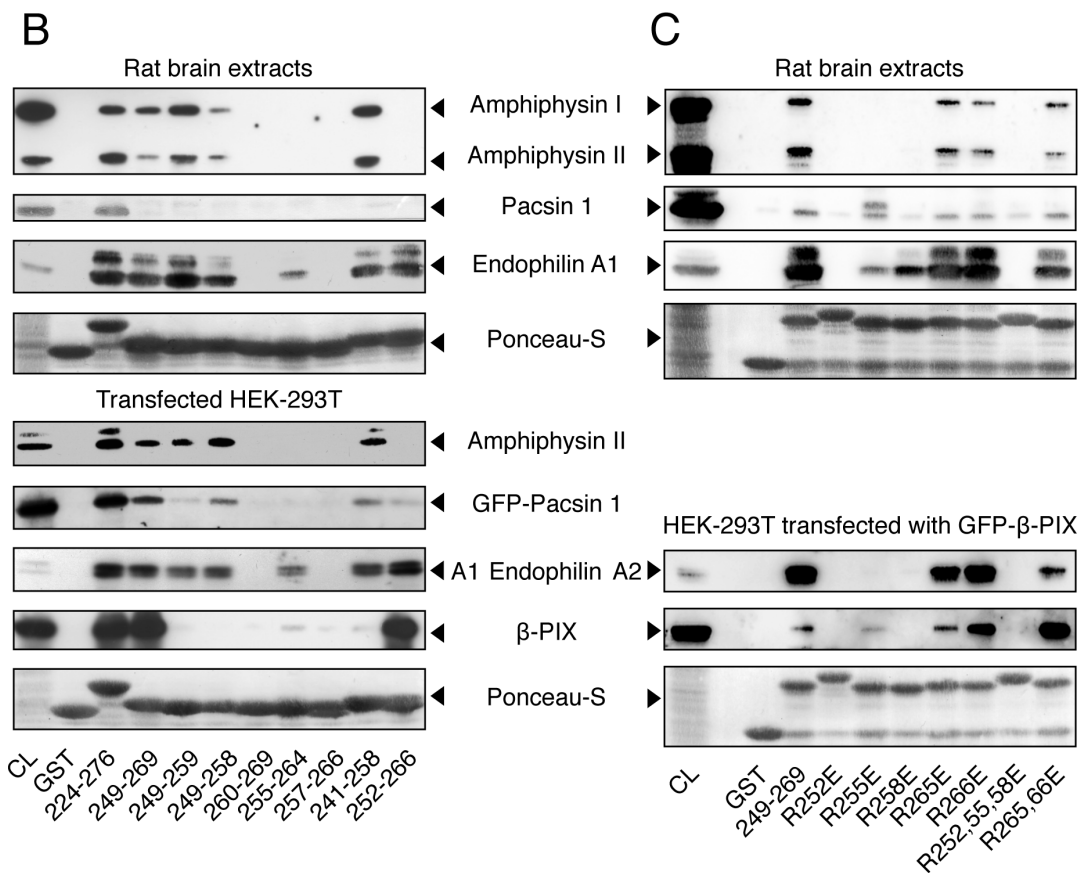
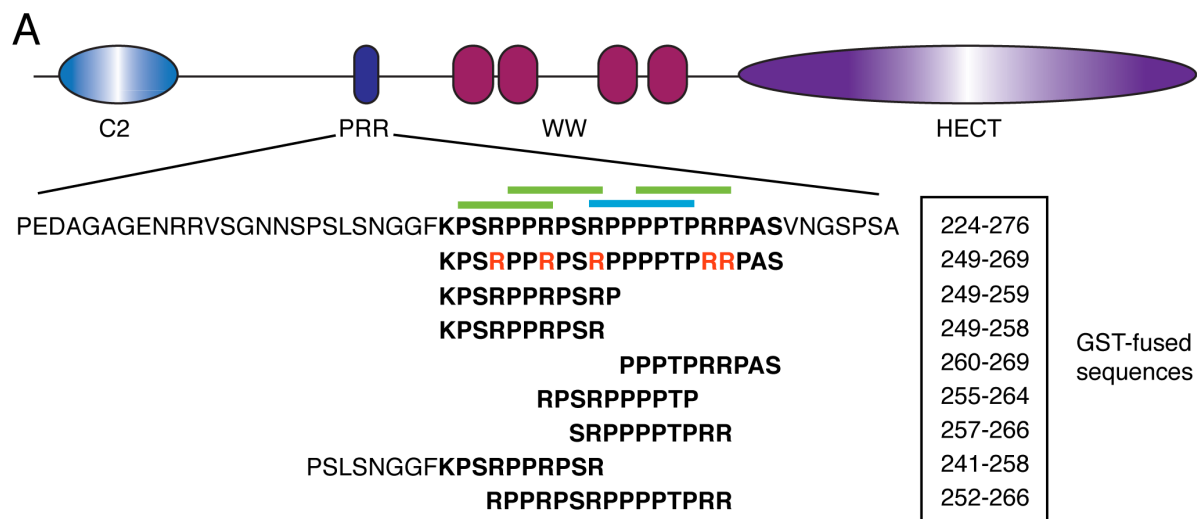
### 3.7. Figures



**Figure 3-1. Representation of a typical SH3 domain interacting with canonical class I and II peptides.**

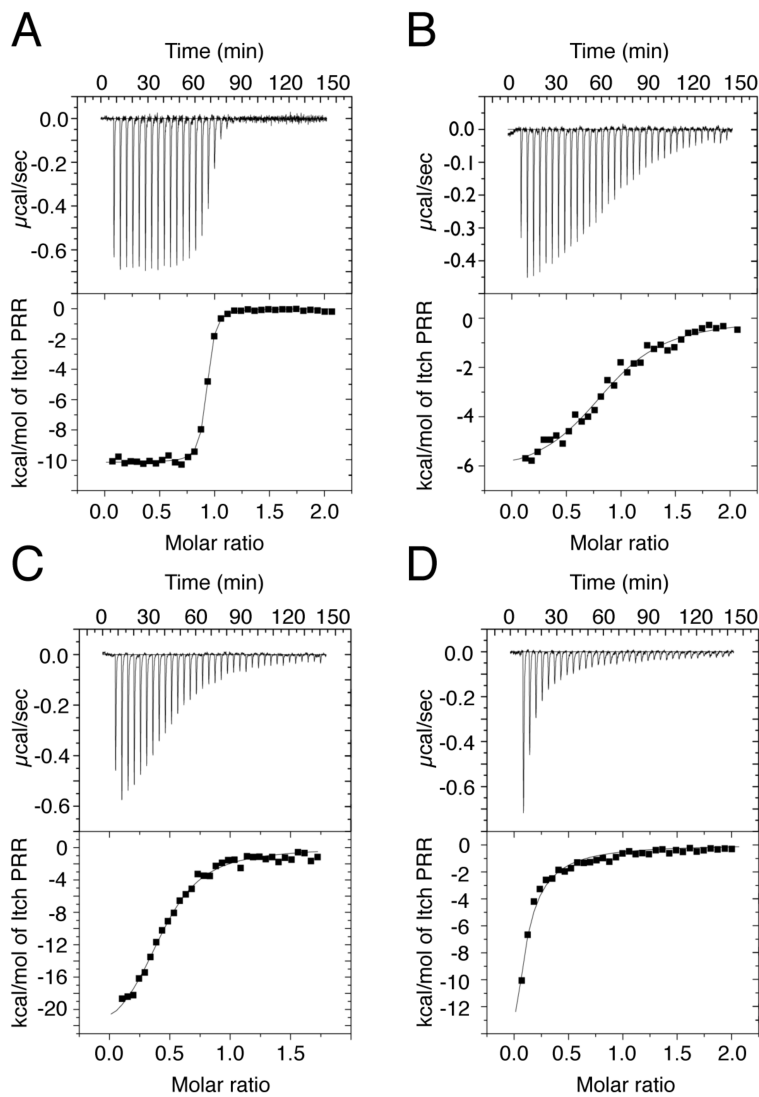
A-D, The SH3 domain of  $\beta$ -PIX is represented in the same orientation and coloured according to a hydrophobicity scale (yellow for hydrophobic). The surface representation reveals the position of the specificity pocket (circle) and hydrophobic pockets (oval shape) accommodating the proline residues of a peptide binding either in a class I (A) or class II orientation (B). C, The SH3 domain of  $\beta$ -PIX is shown in a cartoon representation to indicate the position of the n-Src and RT loops. D, The SH3 domain of  $\beta$ -PIX is represented as in A with key residues of the SH3 domain at the binding interface represented as red sticks. E, Alignment performed with clustalW2 of a subset of SH3 domains that were shown to interact with the PRR of Itch. Fully conserved residues, residues with strongly similar properties and weak similar properties are respectively coloured blue, green and red. Arrowheads indicate the position of the residues represented as sticks in D.





**Figure 3-2. Binding preferences of the SH3 domains of Amphiphysin, Pacsin, Endophilin and  $\beta$ -PIX towards the PRR of Itch.**

A, Schematic representation of the ubiquitin ligase Itch displaying the PRR and the specific subsequences used in this study. Arginine mutations in the 249-269 peptide are indicated in red. Canonical class I and II binding sites are coloured green and blue. B, Rat brain extracts were pulled-down with the indicated GST-PRR fusions. Immunoblot were performed with anti-Amphiphysin, anti-Endophilin and anti-Pacsin 1 antibodies to show their recuperation and content in 5% of the cell lysates (CL) (top pannels). Extracts from HEK-293T cells transfected with the indicated constructs were pulled-down using the same GST-fusions. The immunoblots were performed with anti-Amphiphysin, anti GFP for detection of GFP-Pacsin 1 and GFP-Endophilin A1 or anti-FLAG for FLAG- $\beta$ -PIX. Immunoblot was performed on 5% of cell lysates (CL) to show protein overexpression (bottom panels). C, Rat brain extracts were pulled-down with the indicated GST-PRR mutant. The immunoblot was performed as in B to reveal endogenous protein expressions in 10% of cell lysates (CL) and their recuperation by pull-down (top panels). Extracts from HEK-293T cells overexpressing GFP- $\beta$ -PIX were pulled-down using the GST-PRR mutants. The immunoblots were performed with anti-pan-Endophilin or anti-GFP to show endogenous endophilin and transfected GFP- $\beta$ -PIX recuperation from the same cell lysate (bottom panels).



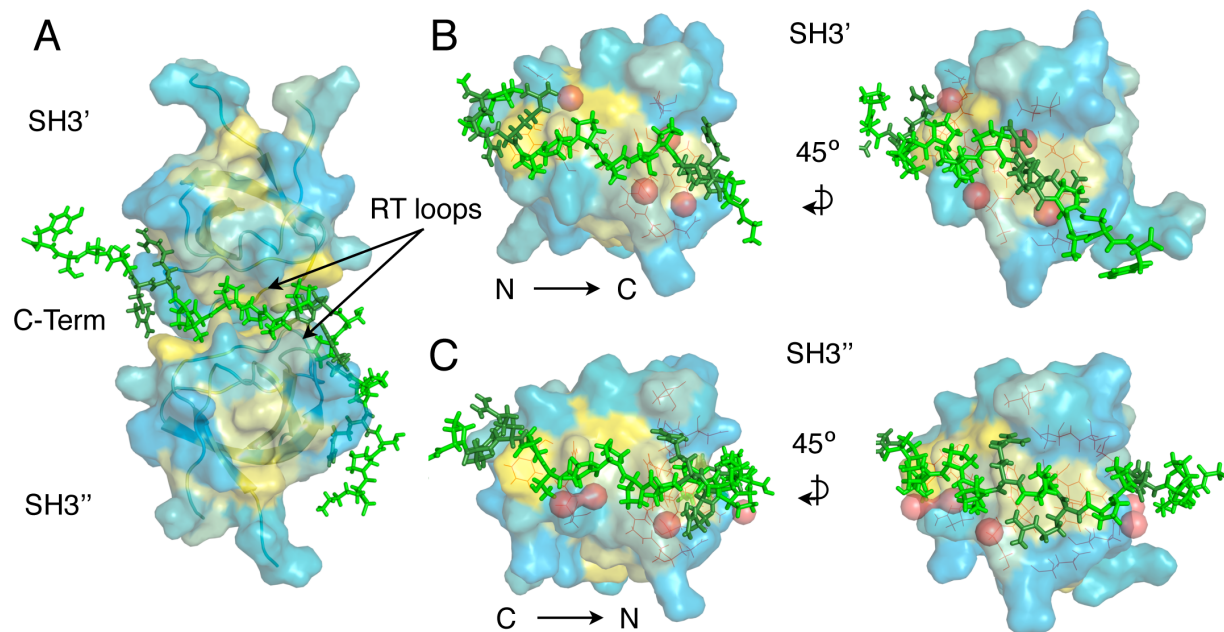
**E**

	PRR (249-269)		PRR (224-276) Previous study <sup>(227)</sup>	
	K <sub>D</sub>	N <sup>(a)</sup>	K <sub>D</sub>	N <sup>(a)</sup>
<b>Endophilin</b>	33.16 ± 1.86 nM	0.96 ± 0.07	45.74 ± 2.66 nM	0.95 ± 0.02
<b>Pacsin</b>	3.80 ± 0.74 μM	0.98 ± 0.11	4.33 ± 0.13 μM	0.96 ± 0.01
<b>β-PIX</b>	1.59 ± 0.39 μM	0.43 ± 0.03	1.44 ± 0.04 μM	0.49 ± 0.02
<b>Amphiphysin</b>	NQ	NQ	NQ	NQ

<sup>(a)</sup> Stoichiometry  
NQ: Not quantifiable

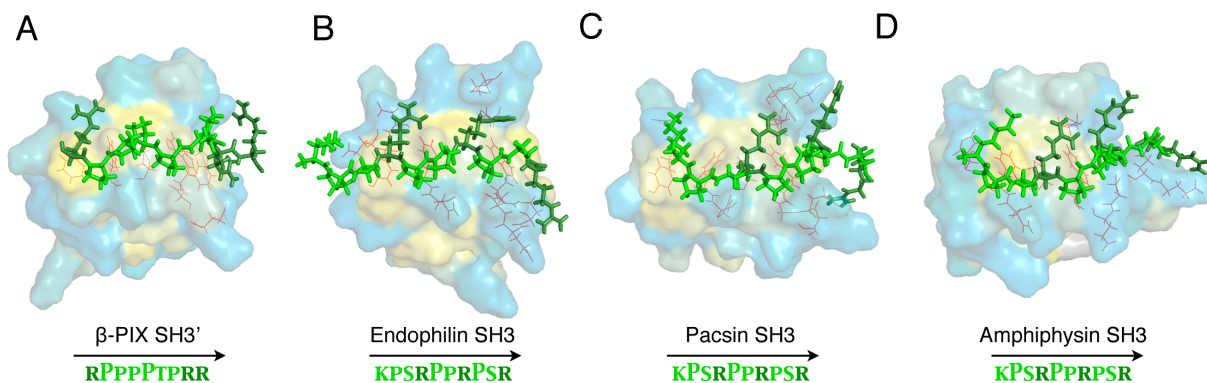
**Figure 3-3. Representative ITC thermograms obtained by successive addition of Itch PRR to a subset of SH3 domains.**

Experiments were performed at 25°C in a 20 mM phosphate buffer pH 7.4 and the results fit to a single-binding site model with a 1:1 stoichiometry. Representative results obtained for A, Endophilin (A), Pacsin (B),  $\beta$ -PIX (C) and Amphiphysin SH3 (D). The calculated affinities and stoichiometries are compiled in E.



**Figure 3-4. Crystal structure of the super SH3 interaction between the PRR of Itch and two  $\beta$ -PIX SH3 domains.**

A, Surface view superposed with a cartoon representation of the SH3 domains coloured according to a hydrophobicity scale (yellow for hydrophobic). SH3' and SH3'' that corresponds respectively to chain A and C present in the crystal structure. The PRR peptide is represented as green sticks with darker arginines. B-C, Close-up view of each of the SH3 domain interacting with Itch PRR. The SH3 domains are oriented as in figure 1 to facilitate comparison of the SH3 binding modes. SH3 residues contributing to the binding or Itch PRR were identified with Ligplot+ and are represented as red lines. Water molecules are represented as red spheres.



**Figure 3-5. Modelling of the interactions mediated by Itch PRR towards additional SH3 domains.**

The complex formed between Itch PRR and SH3' (A) is shown here as a comparison with the models obtained (B-D). FlexPepDock protocol was performed using the structure of the SH3 domains as a template. The binding interface between Itch PRR and these SH3s was modelled as detailed in the *experimental procedures*. The sequence KPSRPPRPSR (residues 249-258) of the ubiquitin ligase Itch (green sticks, darker arginines) interacts with the SH3 domains of Endophilin (B), Pacsin (C) and Amphiphysin (D). The surface of the SH3 domains is coloured according to its hydrophobicity. Residues establishing either a hydrophobic contact or a hydrogen bond with Itch PRR were defined using LigPlot+ and are represented as red lines. Prolines forming the core PxxP motif are identified below the model.

**Table 3-1. SH3 domain-containing proteins interacting with Itch PRR identified by mass spectrometry\*.**

**GST-Itch PRR (residues 249-269) - Upper gel**

Identity	Ensembl	Total spectra	Unique peptide	%/%	MW
Endophilin A1	ENSP00000369981	560	46	64/100	39.9
Spectrin Alpha	ENSP00000361824	46	36	18/22	284.9
Endophilin A2	ENSP00000269886	45	13	36/51	41.5
Endophilin A3	ENSP00000391372	18	6	10/14	39.3
Amphiphysin II	ENSP00000365281	7	5	19/26	47.5
Paccin1	ENSP00000244458	2	2	5.9/8	50.9
Endophilin B2	ENSP00000361645	1	1	3.0/5	43.9
SNX18	ENSP00000317332	1	1	1.8/3	68.9
v-Src	ENSP00000362680	1	1	1.3/2	59.8

**GST-Itch PRR (residues 249-269) - Lower gel**

Endophilin A1	ENSP00000269886	138	18	45/72	39.9
Endophilin A2	ENSP00000369981	18	5	20/28	41.5
Grb2	ENSP00000376347	12	5	29/32	25.2

**GST-Itch PRR (residues 224-276) - Upper gel**

Endophilin A1	ENSP00000369981	348	33	60/96	39.9
Endophilin A2	ENSP00000269886	44	17	36/52	41.5
Spectrin Alpha	ENSP00000361824	41	34	19/24	284.9
Amphiphysin I	ENSP00000317441	18	11	22/39	71.9
Endophilin A3	ENSP00000391372	17	9	24/33	39.3
Paccin1	ENSP00000244458	6	6	19/26	50.9
Cortactin	ENSP00000317189	5	3	9.4/17	57.4
v-Src	ENSP00000362680	3	2	5.4/8	59.8
LASP1	ENSP00000325240	3	2	11/15	29.7
DBNL	ENSP00000411701	2	2	10/16	48.2
Paccin2	ENSP00000263246	2	2	5.1/9	55.7
SNX18	ENSP00000317332	2	2	1.4/2	68.9
Amphiphysin II	ENSP00000352264	1	1	3.1/4	71.4
CD2AP	ENSP00000202773	1	1	2.8/4	32.7
SNX9	ENSP00000376024	1	1	2.2/4	66.5
STAC	ENSP00000273183	1	1	4.0/5	44.5

\*Data were analyzed with the human genome using The Global Proteome Machine Organization (Craig et Beavis, 2004)

%/%: the amino acid coverage of the protein in this assignment / the coverage corrected for peptide sequences that are unlikely to be observed using normal proteomics methods

Upper gel and lower gel refers to portion of the gel above or below GST-Itch PRR fusion protein.



**Table 3-2. Data collection and refinement statistics.****Data Collection**

Beamline	X25, NSLS
Wavelength (Å)	1.1
Space group	P1
Unit-cell parameter (Å)	a=28.846, b=43.447, c=61.479, $\alpha=90.38$ , $\beta=101.01$ , $\gamma=105.25$
Resolution (Å)	35.37-1.5 (1.554-1.5)
No. of unique reflections	41,782 (3,451)
Multiplicity	1.7 (1.4)
Completeness (%)	92.49 (73.38)
Rmerge	0.027 (0.68)
I/s(I)	23.81 (4.99)

**Refinement Statistics**

Resolution (Å)	35.37-1.5 (1.554-1.5)
Reflections (total/test)	41,777 / 1,776
Rwork/Rfree (%)	12.71 / 16.29 (16.72/26.84)
No. of atoms (excluding hydrogens)	
Protein	2354
Water	387
B factors	18.82
Protein	17.78
Water	25.14
Rmsds	
Bond lengths (Å)	0.010
Bond angles (°)	1.228
Ramachandran <sup>b</sup>	
Favored (%)	98.92
Allowed (%)	1.08
Outliers (%)	0.00
Clashscore	2.83
Data cutoff	$F_o > 0$

Values in parentheses are for highest resolution shell

<sup>b</sup>MolProbity analysis

## **4. Chapitre 4**

### **Ubiquitylation de la protéine Grb2 par la ligase de l'ubiquitine Itch**

**Article 3:** Ubiquitylation of growth factor receptor-bound protein 2 by the ubiquitin ligase  
Itch

Article en préparation

## 4.1. Mise en contexte

L'analyse par spectrométrie de masse réalisée au chapitre 3 nous a permis d'identifier plusieurs protéines à domaine SH3 ayant la capacité d'interagir avec la PRR d'Itch. Parmi les protéines identifiées, Grb2 est particulièrement intéressante en raison de son rôle majeur dans l'endocytose et la signalisation cellulaire. De plus, la structure de Grb2 diffère de la majorité des protéines à domaine SH3 interagissant avec Itch. Grb2 est ainsi composée d'un domaine SH2 central bordé de part et d'autre par des domaines SH3. Ces domaines peuvent lier individuellement certains partenaires, tandis que d'autres requièrent la participation commune de ces domaines. Nous avons d'abord confirmé la proximité entre Itch et Grb2 *in vivo* à l'aide du BRET. Par la suite, des essais de pull-down nous ont permis de déterminer que les deux domaines SH3 de Grb2 sont requis afin de lier efficacement la PRR d'Itch. Des analyses par ITC ont démontré que la stoechiométrie de ce complexe est de 1 :1 et est comparable à la majorité des interactions SH3-PRR. Nous avons ensuite déterminé les préférences de liaison de Grb2 envers la ligase. Ces travaux nous ont permis d'identifier une courte séquence au sein de la PRR liant Grb2. Collectivement, ces travaux suggèrent qu'Itch puisse établir un complexe super SH3 avec Grb2. Finalement, nous avons évalué la capacité d'Itch à ubiquityler Grb2. Nos données révèlent pour la première fois une telle modification post-traductionnelle de Grb2. La présence de plusieurs bandes correspondant à Grb2 ubiquitylé *in vivo* suggèrent la polyubiquitylation du substrat. L'Endophiline démontre un patron similaire et il fut démontré que son ubiquitylation par Itch entraîne sa dégradation. Cependant, nous n'avons noté aucun effet d'Itch sur la stabilité de Grb2. Afin de mieux comprendre les rôles de cette modification, nous avons analysé le type d'ubiquitylation impliqué. Ces essais *in vitro*

nous ont permis de conclure majoritairement à la monoubiquitylation de Grb2 sur un site principal. Il pourrait aussi y avoir parmi les 15 lysines de Grb2 un second site admettant l'ubiquitylation d'une faible proportion de Grb2. Les différences observées suggèrent la participation d'un autre facteur influençant le patron d'ubiquitylation de Grb2 *in vivo*. Bien que la fonction précise de l'ubiquitylation de Grb2 inconnue, nous pouvons spéculer qu'à l'instar d'autres modifications post-traductionnelles de Grb2, son ubiquitylation puisse réguler ses interactions et influencer l'établissement de la signalisation cellulaire.

Les résultats présentés dans ce chapitre seront bientôt soumis pour publication. J'ai effectué la collecte des données, leurs analyses et la rédaction de ce manuscrit, révisé par la suite par tous les auteurs. La conception des expériences fut réalisée conjointement avec ma directrice Annie Angers ainsi que James G. Omichinski pour les analyses par ITC. Mathieu Lussier-Price a aussi fourni une aide indispensable à ce projet en supervisant la purification des protéines nécessaires aux analyses par ITC.

# **Ubiquitylation of growth factor receptor-bound protein 2 by the ubiquitin ligase Itch**

Guillaume Desrochers<sup>1</sup>, Laurent Cappadocia<sup>2</sup>, Mathieu Lussier-Price<sup>2</sup>, James G. Omichinski<sup>2</sup>,  
and Annie Angers<sup>1</sup>

Department of Biological Sciences<sup>1</sup> and

Department of Biochemistry and Molecular Medicine<sup>2</sup>

University of Montreal

Montreal, Quebec

H3C 3J7, Canada

Article en préparation

## 4.2. Abstract

Growth factor receptor-bound protein 2 is recruited to the plasma membrane by activated receptors and links them to their intracellular effectors and the endocytic machinery. It thereby plays a central role in the establishment of signalling cascades and of large protein complexes helping to regulate growth factor and other receptors signalling. In bioluminescence resonance energy transfer assays aimed at exploring the range of SH3 containing-domain proteins recognition by the ubiquitin ligase Itch proline-rich region (PRR), we found that one of the strongest signal was obtained with Grb2 GFP fusions. This strongly suggested that Grb2 might be the target of Itch ubiquitin ligase activity. Grb2 posttranslational modifications have been shown to influence its role in signalling. To explore further the relation between Itch and Grb2, we used a combination of BRET, isothermal titration calorimetry (ITC), and pull-down analyses to characterize the interaction between Grb2 and Itch, and examined Grb2 ubiquitylation using in cell and *in vitro* ubiquitylation assays. Grb2 forms an atypical complex with Itch PRR, where both of Grb2's SH3s are required for binding. We mapped the preferred binding site to an extended type I SH3 binding motif, and developed a potential complex model. We also found that Grb2 is indeed the target of Itch being readily ubiquitylated by the ligase, although this ubiquitylation did not lead to Grb2 degradation. These results represent the first demonstration of Grb2 ubiquitylation and implicate this post-translational modification as a regulator of Grb2 function and cell signalling.

### **4.3. Introduction**

Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) is a small adaptor protein composed of two Src homology (SH) 3 domains flanking a central SH2 domain. This protein plays an essential role in the establishment of major signalling cascades notably by linking activated receptor tyrosine kinases (RTKs) to their effectors. Upon growth factor stimulation, Grb2 is rapidly recruited to the plasma membrane via the binding of its SH2 domain to phosphotyrosine motifs of activated receptors (190,236). The SH3 domains of Grb2 then recruit key effectors such as Son of Sevenless 1 (Sos1) and Grb2-associated-binding protein 1 (Gab1), thereby promoting Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, or phosphatidylinositol-3-kinases (PI3Ks) and Akt signalling (237). The impact of Grb2 is not limited to RTKs, as Grb2 required for the G-protein coupled receptors capacity to activate Ras and Erk1/2 signalling (238,239). In addition to these crucial roles in cell signalling, Grb2 plays a major role in receptor internalization by recruiting the Casitas B-lineage lymphoma (Cbl) ubiquitin ligase to activated receptors via its SH3 domains. Recruitment of Cbl to activated RTKs promotes their ubiquitylation and endocytosis (80,240,241).

The establishment of signalling protein networks driven by Grb2 is modulated by post-translational modifications of Grb2 itself. The oncogenic tyrosine kinase Bcr/Abl phosphorylates Grb2 on several tyrosine residues and phosphorylation of Y209, located in the second SH3 domain of Grb2, directly inhibits the binding of Sos1 (192). Likewise, Grb2 phosphorylation by fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) on the same tyrosine also disrupts its interaction with the receptor, releasing the receptor from its Grb2-induced inhibition (242,243). Grb2 also conjugates to the small ubiquitin-related modifier (SUMO) 1 upon overexpression of the SUMO E2 ligase Ubc9. SUMO 1 attaches on the K56 residue

located in the linker region between the N-terminal SH3 domain and the SH2 domain of Grb2. This modification facilitates the formation of the Grb2-Sos1 complex, and increased MAPK activation (244).

We have previously shown that the ubiquitin ligase Itch contains a proline rich region (PRR) that enables it to strongly interact with SH3 domain-containing proteins, and to induce ubiquitylation of most of these proteins (24,81,227). Itch is located to the trans-Golgi network and endosomal compartments. This specific location enables its interaction with proteins internalized from the plasma membrane. We have demonstrated that Itch interacts with the endocytic proteins Endophilin, Amphiphysin and Pacsin. Polyubiquitylation of Endophilin was further shown to impact EGFR trafficking and signalling (24,81). The PRR of Itch is composed of three canonical class II and one class I SH3-binding site that can accommodate several binding partners. Here, we evaluated the binding capacity of the ubiquitin ligase Itch towards Grb2. We found that Grb2 affinity for Itch is high, but that both Grb2 SH3 domains were required for efficient binding of Itch PRR. We have further found that Grb2 is readily ubiquitylated by the ligase in a non-degradative process, suggesting that ubiquitylation might rather play a role in the regulation of Grb2 interactions. This work thus demonstrates a novel post-translational modification for a crucial mediator of RTK signalling.

## **4.4. Experimental procedures**

### **4.4.1. Cell culture, transfection and treatments**

Human embryonic kidney (HEK)-293T cells were obtained from the ATCC and were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in high glucose DMEM (Gibco) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone), penicillin (Invitrogen, 100 U/ml) and streptomycin (Invitrogen,



100 mg/ml). Cells were transfected with the indicated plasmids using calcium/phosphate precipitates (205). Typically, cells were transfected using 5 µg of plasmid/55 cm<sup>2</sup> and extracted 48 hours post-transfection. For degradation studies, cells were treated overnight with 5 µM MG-132 (Boston Biochem) or DMSO as a control. Where needed, 100 ng/ml EGF (Feldan Bio) was added for 2 hours before extraction.

#### **4.4.2. Plasmids**

Plasmids encoding GST-Grb2 WT, P49L and G230R were kind gifts from PS McPherson (Montreal Neurological Institute, McGill University). Ha-Ubiquitin and Myc-Itch were generously provided by TM Dawson (Johns Hopkins University School of Medicine) and G Walz (University Hospital Freiburg), respectively. FLAG-Itch WT or CA as well as rLuc-Itch were described previously (24,29). GST-fusions of Itch WT, WW and PRR (residues 224-276) were also used in a previous study (206). GFP-Grb2 was a kind gift from M Kay (Cancer research UK). For large-scale protein purifications, we replaced the Thrombin cutting site with a TEV-recognized sequence within pGEX-4T1 for GST-Grb2 and GST-PRR. The others PRR sub-sequences were produced by annealing the primers (Thermo Fisher) coding the indicated amino acids with an additional tyrosine to facilitate protein quantification by spectrometry. Point mutations were further introduced in the pGEX-4T1 vector encoding Itch PRR residues 249-269.

#### **4.4.3. Antibodies**

Polyclonal antibodies against GFP were purchased from Thermo Fisher Scientific (A11122). Monoclonal antibodies against the FLAG and HA epitopes were purchased from Sigma-Aldrich (F3165, H9658). Anti-Myc monoclonal antibodies were from Enzo Life

Sciences (SA294-0500). Monoclonal antibodies against Grb2 are from BD Biosciences (610111) and c-Jun from Merck Millipore (05-1076). Goat anti-rabbit-HRP or goat anti-mouse-HRP IgG were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (111-035-003, 115-035-003).

#### **4.4.4. BRET experiments**

HEK-293T cells were cotransfected by calcium/phosphate with fixed amounts of cDNAs coding for rLuc-Itch and increasing concentrations of GFP-Grb2 (varying from 0 to 1.25  $\mu\text{g}/9.5 \text{ cm}^2$ ). Forty hours post-transfection, the cells were washed in PBS, collected in 1 ml Tyrode's solution, and diluted to  $10^6$  cells/ml. Coelenterazine (Biotium) was added at a final concentration of 5  $\mu\text{M}$ . Total fluorescence was measured in a FlexStation apparatus (Molecular Devices, Sunnyvale). Luminescence and fluorescence were quantitated with a Mithras LB 940 apparatus (Berthold Technologies). Three measures were obtained: light emitted at  $485 \pm 20 \text{ nm}$  by rLuc, emission of fluorescence at  $530 \pm 25 \text{ nm}$  with excitation due to energy transfer from rLuc to GFP, and total emission of fluorescence at 530 nm after excitation at 485 nm to measure total expression of GFP fusion proteins. The BRET ratio was defined as (emission due to energy transfer at 530 nm) / (emission at 485 nm) – Cf, where Cf corresponds to (emission due to energy transfer at 530 nm) / (emission at 485 nm) for rLuc-fused Itch expressed alone in the same experiment. The calculated BRET signal is then plotted against the Fluorescence/Luminescence ratio that represents the cellular content of GFP and rLuc relative to each other. The Fluorescence/Luminescence is thus defined by [(total emission of fluorescence at 530 nm after excitation) – (total emission of fluorescence at 530 nm after excitation for rLuc-fused Itch expressed alone in the same experiment)] / (emission at 485 nm) (208,245). Results were obtained from at least three independent experiments.

Transfection conditions can vary for some proteins between experiments to ensure the presence of a variety of protein expression ratios required for subsequent curve fitting. BRET ratios were plotted against the ratio of measured fluorescence and luminescence for each point. A Fluorescence/Luminescence cutoff of 0.7 was set and aberrant data resulting from negligible luminescence levels (<10000 counts) or from total fluorescence levels lower than the background were omitted.

#### **4.4.5. Pull-down experiments**

Transfected HEK-293T cells were washed in PBS and resuspended in buffer A (20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl) plus protease inhibitors. The cells were lysed by sonication and Triton X-100 was added to a final concentration of 1%. For brain extracts, frozen rat brains (Pel-Freez Biologicals) were homogenized in buffer A and centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes before Triton X-100 was added to the resulting supernatant. Extracts were incubated for 20 minutes at 4°C and centrifuged at 15 000 rpm, 4°C. Extracts were incubated with 10 µg of the appropriate GST fusion protein coupled with Glutathione (GSH) Sepharose 4B (BioWorld) for 16 hours at 4°C. Beads were washed extensively in the same buffer and prepared for Western blot analysis. In an effort to normalize the quantity of GST fusion proteins used in each assay, purified beads were run on a 10% SDS-PAGE along with a standard curve ranging from 1 to 10 µg of BSA. The gel was stained with Coomassie and densitometry analysis allowed the determination of the volume of beads needed to obtain the desired amount of GST fusion.

#### **4.4.6. Western blot**

Protein extracts and purified proteins obtained by pull-down assays were separated by SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose for blotting with the appropriate primary and secondary antibodies. 0.1 µg /ml of goat anti-rabbit-HRP or goat anti-mouse-HRP conjugated IgG were used (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Antibody incubation and membrane washing were performed in PBS supplemented with 5% dry milk and 0.05% Tween 20. Immunoreactivity was detected by chemiluminescence using West-Pico SuperSignal (Thermo Fisher Scientific).

#### **4.4.7. Large-scale expression and purification of proteins**

Full-length Grb2 and Itch PRR (residues 224-276) were expressed in *E. coli* host strain TOPP2 (Stratagene) as GST-fusion proteins. The cells were grown at 37°C in Luria Broth media, and protein expression was induced for 4h at 30°C with 0.7 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Inalco). The cells were harvested by centrifugation, resuspended in either Grb2 lysis buffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.2, 150mM NaCl, 5 mM EDTA, and 3mM DTT) or PRR lysis buffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.4, 1 M NaCl, 1mM EDTA, and 1 mM DTT). Cells were passed through a French press and centrifuged at 105,000 X g for 1h at 4°C. The supernatant was then collected and incubated for 1h with GSH Sepharose 4B resin (GE Healthcare) at 4°C. Following incubation, the resin was collected by centrifugation and washed with lysis buffer and TEV buffer (25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 125 mM NaCl, and 5 mM DTT). The GST tag was cleaved by incubating the resin for 2h with 100 units of TEV protease. The proteins were eluted by extensive washes in TEV buffer. Grb2 proteins were further purified using Q-Sepharose High Performance (GE Healthcare). PRR peptides were further purified over a C4-reverse phase HPLC column (Vydac). Proteins and peptides were desalted,

quantified by absorbance at 280 nm, flash frozen and lyophilized and kept at -80°C until being processed for ITC experiments.

#### **4.4.8. Isothermal titration calorimetry studies**

ITC titrations were performed at 25°C in 20 mM phosphate buffer at pH 7.4 using a MicroCal VP-ITC system. Concentrations of injected PRR peptides in the syringe and SH3 domain proteins in the cell varied respectively from 150 to 450  $\mu$ M and from 15 to 45  $\mu$ M. Data were analyzed using MicroCal Origin Software and all experiments fit the single binding site model with a 1:1 stoichiometry. Errors in  $K_D$  values were estimated from duplicate measurements.

#### **4.4.9. Ubiquitin linkage screening**

GSH resin bound to GST-fused Itch or Grb2 were prepared as detailed above. For a typical purification, 30U of Thrombin (MP Biomedicals LLC) were added to 1 ml PBS. Cutting reaction was performed 2 hours at room temperature before recuperation of the supernatant. Purified proteins were quantified as described in the pull-down section. The ubiquitin linkage screening kit was supplied with the E2 enzyme Ube2L3 (C2900) and used as recommended by the manufacturer (J3220, UBP Bio). Ubiquitylation reactions were performed at room temperature for 90 minutes before proceeding to a SDS-PAGE and Western blot analysis.

#### **4.4.10. Modelling**

The sequence PSRPPRPSR was extracted from Itch PRR in complex with  $\beta$ -PIX (pdb:2P4R) and was aligned to residues 904-911 of Cbl PRR in the Cbl- $\beta$ -PIX complex (pdb:2AK5).  $\beta$ -PIX SH3 A and B were then replaced respectively with Grb2 C-terminal and

N-terminal SH3 structure obtained from the chain A of the dimeric Grb2 (pdb:1GRI) (246). The resulting chimeric structure was then used as a template for the high-resolution modelling protocol FlexPepDock, implemented with the Rosetta framework. This protocol was proven to be highly efficient in a benchmark for modelling protein complexes (231,232). FlexPepDock produced 300 low resolution and 300 high-resolution structures. The resulting models had a peptide backbone r.m.s.d. of more than 13 Å compared to the initial peptide structure 2AK5, showing that the flexible docking procedure was not only exploring local minima. The representation of the best model according to FlexPepDock score was done with PyMol (Schrödinger). The surface hydrophobicity script was generously provided by HA Steinberg (Artforscience) that derived from a scale by SD Black and DR Mould.

## **4.5. Results**

### **4.5.1. Grb2 interacts with Itch PRR**

During screening for possible interactions with Itch PRR, Grb2 was identified as a potential binding partner (Desrochers et al, *unpublished data*). To further evaluate a possible interaction between Itch and Grb2, HEK-293T cells were transfected with a constant amount of rLuc-Itch and increasing amounts of GFP-Grb2. Cotransfection with GFP alone yielded the background-level signal depicted by a slow ascending linear fit. A semi-logarithmic BRET curve was obtained with increasing concentrations of GFP-Grb2, indicating increased proximity compatible with a significant interaction between rLuc-Itch and GFP-Grb2 (Figure 4-1A).

Itch has a PRR composed of a succession of SH3 binding motifs that could potentially accommodate either of Grb2 SH3s. Itch also has 4 WW domains mediating interaction with

short proline-based motifs, most often PPXY, but also with some proteins not containing any typical motifs like Cbl and Deltex (39,211). To determine the basis of the potential interaction between Itch and Grb2, we evaluated the binding capacity of both proteins different modules. We first performed pull-down analysis of HEK-293T cells transfected with GFP-Grb2 with GST-fusion proteins of full-length Itch (WT), WW domains or PRR (Figure 4-1B). The anti-GFP immunoblot of the pull-down fractions reveals a strong interaction between Grb2 and both Itch WT and its isolated PRR. No GFP-Grb2 protein was detected in the GST-Itch-WW pull-down, suggesting that the interaction relies solely on the presence of Itch PRR and presumably Grb2 SH3 domains.

#### **4.5.2. Both SH3 domains of Grb2 are required for binding to Itch**

Grb2 has two SH3 domains on each side of a single SH2 domain. We thus addressed the binding capacity of each Grb2 SH3. We performed a pull-down analysis on HEK-293T cells transfected with GFP-Itch using GST-tagged Grb2, or Grb2 containing a point mutation inactivating its N-SH3 (P49L), C-SH3 (G203R) or both (double) (247). The anti-GFP immunoblot indicates a strong interaction between Itch and Grb2, but the inactivation of either SH3 domain of Grb2 caused a drastic diminution of the interaction. Thus, both Grb2 SH3 domains are required for the full binding of Itch PRR (Figure 4-1C).

#### **4.5.3. Itch interacts directly with Grb2**

Although BRET and pull-down analysis strongly suggest that the interaction between Itch and Grb2 is direct, we cannot rule out the possibility that a third protein could bring them together as a complex. For example, Cbl is known to bind both proteins and could act as an adaptor (211,248). To confirm a direct binding, we conducted isothermal titration calorimetry

(ITC) experiments. Multiple injections of purified Itch PRR in a cell containing one-tenth the molar concentration of purified Grb2 indicates a direct binding with an estimated  $K_D$  of  $3.37 \pm 0.40 \mu\text{M}$  (Figure 4-2). Such affinity is consistent with the vast majority of PRR-SH3 interactions reported with  $K_D$  in the low micromolar-range and consistent with the strong binding observed in pull-down assays (43,47). ITC experiments conducted with a single SH3 domain showed the formation of a complex with much lower binding affinity, in accordance with the pull-down assays (not shown). Interestingly, the fitted isothermal curve for the full-length protein binding to the Itch PRR suggests that the stoichiometry of this complex is 1:1, despite the fact that both SH3s are required to achieve the full binding of the complex.

#### **4.5.4. Identification of sequences within Itch PRR that are targeted by Grb2 SH3 domains**

Grb2 N-SH3 domain was previously found to interact with the consensus sequence PX $\psi$ PXR (199,204). Grb2 C-SH3 was also found to bind this motif when flanked by additional arginines, and to atypical motifs such as RXXK sequences within Gab1 (249,250). Since both SH3s are required for the binding of Itch, we wanted to identify the minimal sequence requirement to accommodate Grb2 binding to Itch. We thus generated peptides containing different GST-fused Itch PRR subsequences. We pulled-down endogenous Grb2 from rat brain extracts and GFP-Grb2 from transfected HEK-293T cells (Figure 4-3B). Taken together, the anti-Grb2 and anti-GFP immunoblots indicate a good interaction for peptides containing the RPPRPSR (residues 252-258). On the other hand, constructs 260-269, 255-264 and 257-266 of Itch showed significantly lower interactions with Grb2, showing that removal or truncation of the RPPRPSR motif is sufficient to abrogate the interaction.



Charged residues play a critical role for binding to SH3 domains (43,47). To further refine the sequence requirement for Itch recognition by Grb2, we mutated each positively charged R between positions 249 and 269 into negatively charged E (228) and evaluated the impact of these mutations on Grb2 binding (Figure 4-3C). Pull-down of endogenous Grb2 from rat brain extract reveals that binding is mostly affected by the mutation of either R252 or R255. Peptides with R258E, R265E and R266 mutations pulled-down a similar amount of Grb2 as the control. In agreement with these results, the combined mutation of the first three R residues almost completely abolished the interaction, whereas the combined mutation of R265 and R266 had no effect. These results clearly point to the crucial role of R252 and R255 in the formation of the Itch-Grb2 complex. Further, they strongly suggest that both SH3 domains of Grb2 are binding to a single site within the PRR of Itch.

#### **4.5.5. Itch ubiquitylates Grb2**

Given the previous demonstration that Itch ubiquitin ligase activity could be directed by binding to its PRR, we next evaluated Grb2 ubiquitylation (24,227). To this end, HEK-293T coexpressing HA-Ubiquitin, GFP-Grb2 and Myc-Itch were harvested for protein extraction. GFP-Grb2 was purified from the extracts using GST-Itch PRR as a probe to pull-down GFP-Grb2, and ubiquitylation was evaluated by blotting the purified proteins with an anti HA antibody. Several high molecular weight bands were detected only in the extracts where both the ligase and Grb2 were present. This result would suggest the GFP-Grb2 is poly or multiubiquitylated only when Itch is present in the cells.

Most substrates of Itch are degraded as a consequence of their ubiquitylation by Itch, including SH3 domain-containing proteins (51,81). The detection of a smear of ubiquitylated Grb2 in the in cell assay prompted us to evaluate Grb2's degradation. To this end, we

transfected Itch WT or its catalytically inactive mutant in HEK-293T cells and treated these cells with a combination of EGF and the proteasome inhibitor MG-132. Cell extracts were then blotted to measure the level of Grb2 and cJun proteins. We included c-Jun in this assay as a control since Itch has been shown to regulate its turnover and EGF treatment increases Itch activity towards cJun (22). As expected, cJun levels are reduced when cells were treated with EGF and upon overexpression of Itch WT compared to its catalytically inactive form (CA) (Figure 4B). It should be noted that in absence of EGF-induced Itch activation, Itch expression doesn't have a significant impact on c-Jun levels and that additional ligases can also induce c-Jun ubiquitylation and degradation (251-255). Inhibition of the proteasome effectively abolished c-Jun degradation. In sharp contrast, when the same cells were blotted with Grb2, Grb2 levels were absolutely comparable in every condition. This result thus shows that despite the induction of Grb2 poly or multiubiquitylation by Itch, Grb2 is not degraded upon Itch expression.

To reconcile these contradictory results, we sought to determine the type of ubiquitin linkage established by Itch on Grb2. We proceeded to *in vitro* ubiquitylation assays where purified Grb2 was incubated with purified Itch and other necessary enzymes in the presence of ubiquitin or various mutant forms designed to restrain the type of available chain linkage. Ubiquitylation was evaluated by an anti-Grb2 immunoblot, where detection of higher molecular band would testify for Grb2 ubiquitylation. (Figure 4-4C). Surprisingly, the anti-Grb2 immunoblot mainly revealed a single ubiquitylated form of Grb2, migrating at about 33 kDa, regardless of the presence of the ubiquitin form present in the assay. In similar conditions and using the same protein preparations except for Grb2, polyubiquitin chains readily formed on Endophilin with WT and K29 forms of ubiquitin (not shown). It should be noted that a faint

band is also visible at 40 kDa in the Grb2 ubiquitylation assay. This band could be attributable to targeting of a second lysine for monoubiquitylation. However, we cannot rule out that this faint band could be due to background signal caused by the presence of Itch degraded peptides at this position. Although additional studies are required to map the precise ubiquitylation sites among the 15 lysines present in the Grb2 sequence, these results clearly indicate that Grb2 is monoubiquitylated by Itch *in vitro*.

## **4.6. Discussion**

The CWH sub-family of ligases is characterized by extremely conserved domains separated by non-conserved linker domains. Inside one of these unconserved regions, Itch presents a conserved PRR of about 20 amino acids that contains three consensus class II and one class I SH3-binding motifs. This region was found to accommodate several SH3 domain-containing proteins such as Endophilin, Pacsin, SNX9 and  $\beta$ -PIX (24,52,227).

BRET analyses conducted here further identified the SH3 domain-containing protein Grb2 as a potential binding partner of Itch, since they are found in close proximity in living cells. Unlike the other SH3 domain-containing proteins previously shown to bind to Itch PRR, Grb2 contains two SH3 domains. Grb2 is a small protein strictly composed of interacting modules and plays a crucial role in the establishment of key signalling complexes. Over the years, many studies attempted to define the binding preferences of both the N- and C-SH3 domains of Grb2. These studies revealed that Grb2 N-SH3 binds the consensus PX $\psi$ PXR within Sos1, Dynamin and Cbl (199,204,256,257). The C-terminal SH3 domain of Grb2 is a more versatile binder and can recognize both class I and class II peptides with similar affinities, as determined by phage display studies (114). The C-SH3 domain was also shown to bind to PX $\psi$ PXR sequences, but required the presence of additional arginine residues

downstream of this motif (199). The C-terminal SH3 domain of Grb2 also binds the atypical PXXRXXKP motif within Gab1 and SLP-76 (216,249). We mapped the preferred binding sequence of Grb2 SH3s and found that disruption of the RPPRPSR sequence at the N-terminal of the Itch PRR was sufficient to limit binding of Grb2, whereas mutations of the class I motif had no effect, strongly suggesting that both SH3 domains interact together within the same region of the Itch PRR. In contrast,  $\beta$ -PIX preferred binding sequence was established to be with an extended class I motif RPPPTPRR sequence located in the C-terminal end of the Itch PRR that overlaps Grb2 binding site at position 258 (52). Thus, Grb2 interaction requires an extended Class II motif that probably interacts simultaneously with both of its SH3s.

Pull-down analysis confirmed that that both SH3 domains are required to achieve full binding. This type of conformation where a single PRR has the capacity to bind simultaneously two SH3 domains is termed “super SH3”. Such structure was first identified in NCF1 where the protein’s PRR is binding to its own SH3 domains (90). Grb2 was also found to sometimes behave like a super SH3 molecule since both of its SH3 domains cooperate for binding with the PRR of Sos1 (199). Because the Itch-Grb2 complex is destabilized by the mutation of a single Grb-2 SH3, a possible configuration would be that the Itch PRR is sandwiched between the N- and C-SH3 of a single Grb2 molecule. Such a complex has never been observed for Itch PRR although it was found to interact simultaneously with two copies of  $\beta$ -PIX SH3. These conformations result in complexes with different stoichiometries, but both involved the binding of two SH3 domains towards a single PRR. Although somewhat unexpected, the calculated affinities of super SH3s are similar and even weaker than those of single SH3s for the same PRR sequence (84,86).

The overall structure of the Grb2 monomer extracted from the dimeric complex indicates that residues at the interface of SH3 domains and the SH2 are disordered and potentially flexible (246). Conformational changes are indeed believed to occur through domain swapping upon dimerization. Grb2 was further shown to be in monomer-dimer equilibrium in solution and only monomers were able to bind Sos (242,258). For these reasons, it is difficult to obtain structural data of protein complexes formed by the interaction of both Grb2 SH3 domains. We have thus modeled their binding with the FlexPepDock protocol (231,232). We selected the Cbl- $\beta$ -PIX complex as a template since we have determined that Grb2 binds to a similar pseudo-symmetrical RPPRPSR sequence within Itch PRR. Moreover, Grb2 SH3s share some conserved key residues with  $\beta$ -PIX that contribute to the binding. The refined structure thus depicts a conformation where Itch PRR is sandwiched between Grb2 SH3s (Figure 4-5 A-C). The arginine residues located at both extremities have their side chains folded over a respective SH3 whereas only the central arginine was able to make hydrogen bonds with both SH3s. Dimerization of these domains was further stabilized by the interaction between residues N51 and N208. This model therefore represents a plausible conformation for the interaction of Itch PRR towards Grb2 SH3 domains.

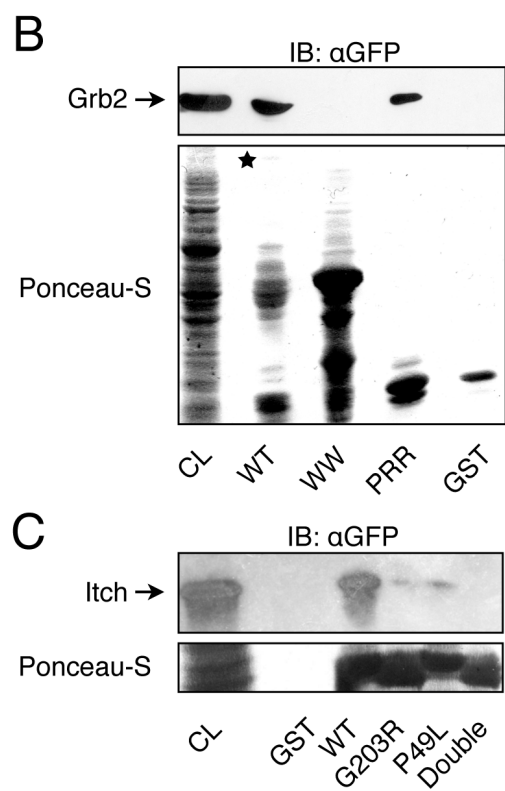
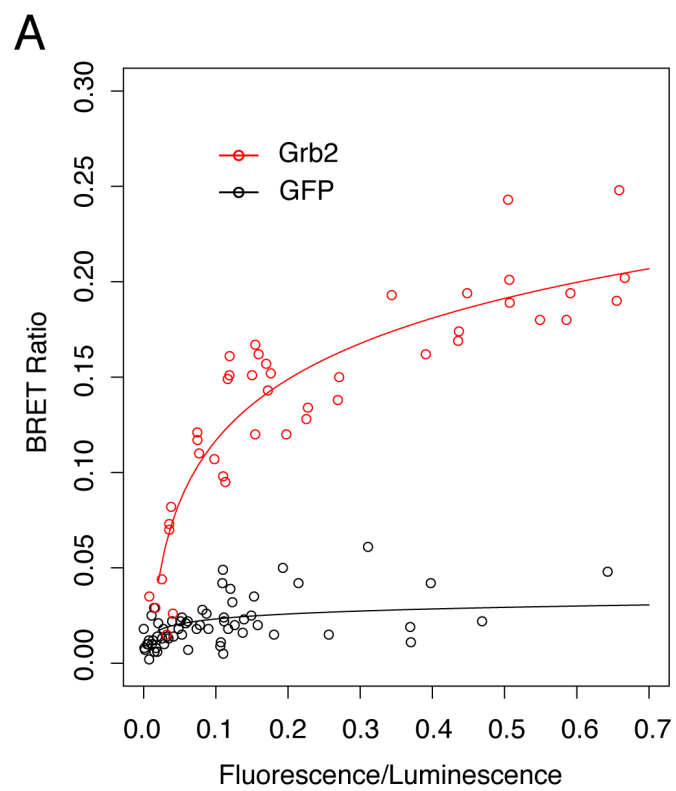
Although Grb2 has no catalytic function, its post-translational modifications have been shown to impact its capacity to trigger the formation of signalling networks. Grb2 phosphorylation on tyrosine 160 (Y160) by different receptor and non-receptor tyrosine kinases has been shown to disrupt Grb2 dimers and promote the formation of MAPK signalling complexes (242). Similar to SUMOylation, the phosphorylation of Grb2 increases the formation of the Grb2-Sos1 complex and promotes MAPK signalling (242,244). We report here that the ubiquitin ligase Itch efficiently binds to Grb2 and promotes its ubiquitylation.

This is the first demonstration that Grb2 can be modified by ubiquitin conjugation. It should be noted that antibodies against the GFP tag of Grb2 failed to recognize the ubiquitylated forms in the pull-down fractions. In similar assays, other SH3 domain-containing proteins didn't display ubiquitylation bands in the pull-down fraction using the antibodies against the tag. Among these proteins, only Endophilin exhibited ubiquitylation bands using the anti-GFP antibody. This could reflect the level of interaction of this specific SH3 domain-containing proteins with the PRR of Itch, which would affect both the recovery in the pull-down assay and the in cell ubiquitylation reaction (227). Nevertheless, we were only able to detect ubiquitylation of Grb2 when Itch was overexpressed, which underlies the specificity of the reaction.

Interestingly, although in cell ubiquitylation assays resulted in poly or multiubiquitylation of Grb2 in response to Itch expression, we failed to detect any degradation of Grb2. Moreover, *in vitro* ubiquitylation assays consistently resulted in monoubiquitylation of Grb2. These results suggest that an additional factor is present *in vivo* to promote ubiquitin chain formation on Grb2. A similar dichotomy has been reported for Itch-induced ubiquitylation of the TGF- $\beta$ -inducible early gene 1 (TIEG-1) transcription factor, on which Itch can promote both mono- and polyubiquitylation. While monoubiquitylation led to the translocation of TIEG1 to the nucleus, Tyk2-dependant phosphorylation of TIEG1 inhibited this mechanism by promoting the formation of K27-linked ubiquitin chains (40,259). Grb2 phosphorylation has been reported, but it has been shown to inhibit its capacity to form a complex with Sos (192,242). The influence of Grb2 phosphorylation on the formation of the complex with Itch remains to be determined, but it is possible that it could enhance Itch ubiquitin ligase activity towards Grb2.

Alternatively, another ligase could cooperate with Itch towards proper Grb2 ubiquitylation. Itch was indeed found to act together with the ubiquitin ligase Cbl, both ligases being required to promote TCR ubiquitylation (260). Itch and Cbl are both recruited by tyrosine kinase receptor activation, as is Grb2, which makes it highly plausible that the three proteins are found in close proximity *in vivo*. The precise cellular conditions promoting Grb2 ubiquitylation thus remain to be determined, but this study shows for the first time that it occurs and identifies the ubiquitin ligase Itch as a key player in this process. Grb2 ubiquitylation is of great interest since the regulation of Grb2 function has repeatedly been shown to crucially influence Ras signalling and oncogenic functions.

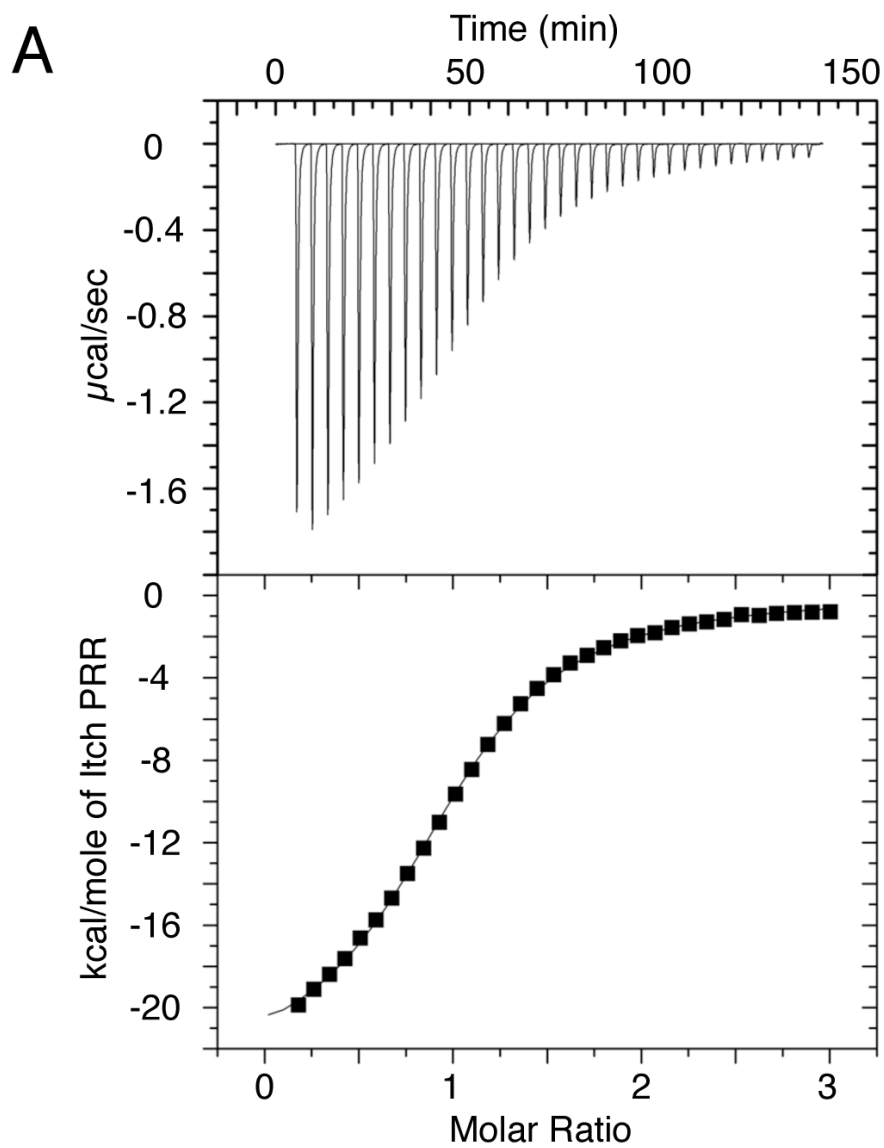
## 4.7. Figures





**Figure 4-1. Itch PRR binds to Grb2 SH3.**

A, Saturation studies performed to provide evidence for a specific interaction between Itch and Grb2. HEK-293T cells were cotransfected with constant amounts of rLuc-Itch and various amounts of GFP-Grb2 or GFP alone as control. BRET ratios were plotted as a function of the excited GFP activity to total rLuc activity ratio, allowing comparison between GFP tagged proteins when expressed at similar levels. Results were obtained from three independent experiments. B, Retrieval of GFP-Grb2 with different GST-Itch fusion proteins. HEK-293T were transfected with GFP-Grb2 and extracted proteins pulled-down with glutathione-Sepharose beads coupled to GST alone (GST), or fusions of GST with full-length Itch (WT), WW domains (WW) or proline-rich region (PRR). 10% of cell lysates (CL) was loaded to the gel to show protein content. An anti-GFP immunoblot was performed to show the presence of GFP-Grb2 (top). Ponceau-S staining reveals the GST fusions. A star indicates the position of GST-Itch WT proteins. Additional bands in this lane result from degradation of the full-length protein most likely retaining much of its binding capacities towards Grb2. C, Extracts of HEK-293T cells transfected with GFP-Itch were pulled-down as in B with the indicated GST-Grb2 constructs. Immunoblot was performed with anti-GFP antibodies to show retrieved Itch.



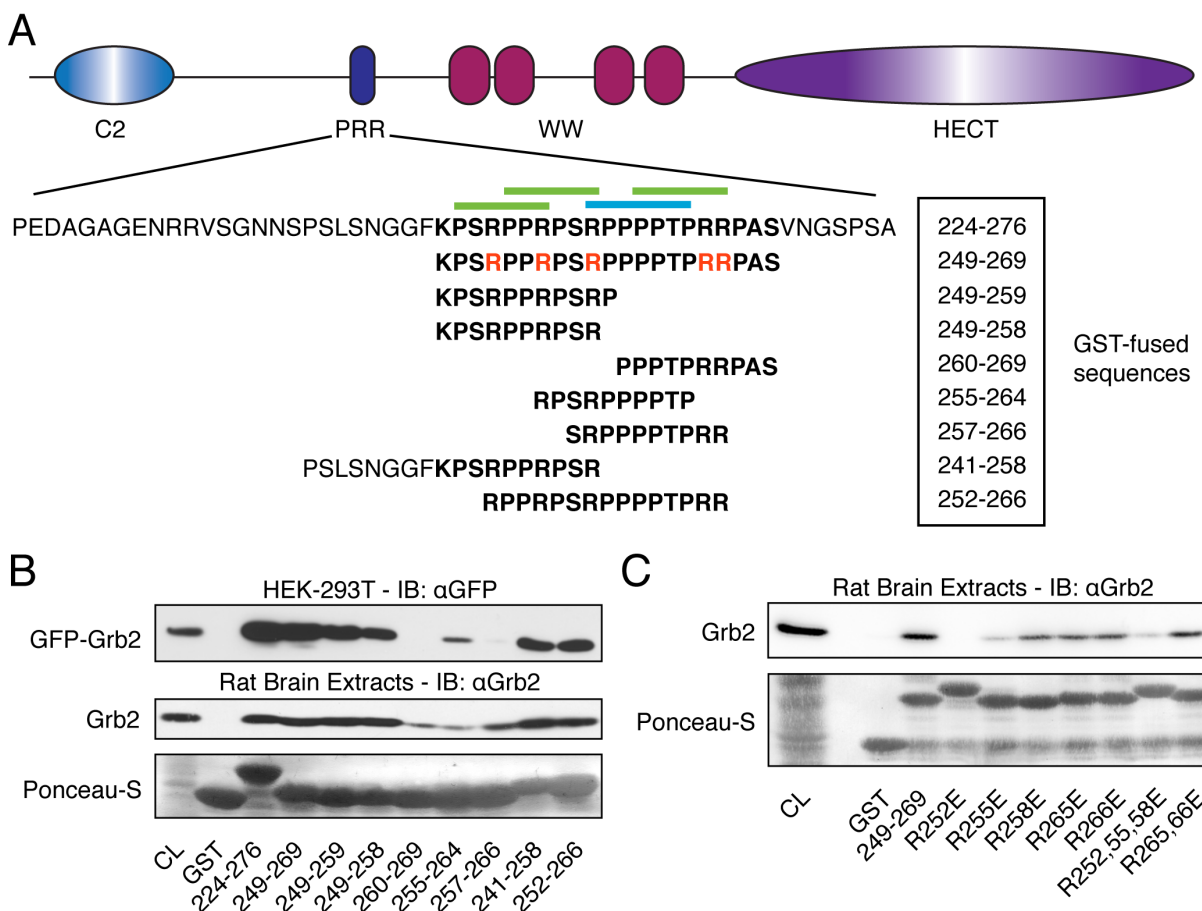
**B**

	$\Delta H$ (kcal/ mol)	$T\Delta S$ (kcal/ mol)	$\Delta G$ (kcal/ mol)	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	$n^a$
<b>Grb2/ PRR</b>	$-22310 \pm 1202.08$	$-14832.97 \pm 1286.02$	$-7477.04 \pm 83.94$	$3.37 \pm 0.40$	$1.00 \pm 0.01$

<sup>a</sup>Molar binding ratio of the Grb2-PRR interaction (observed stoichiometry)

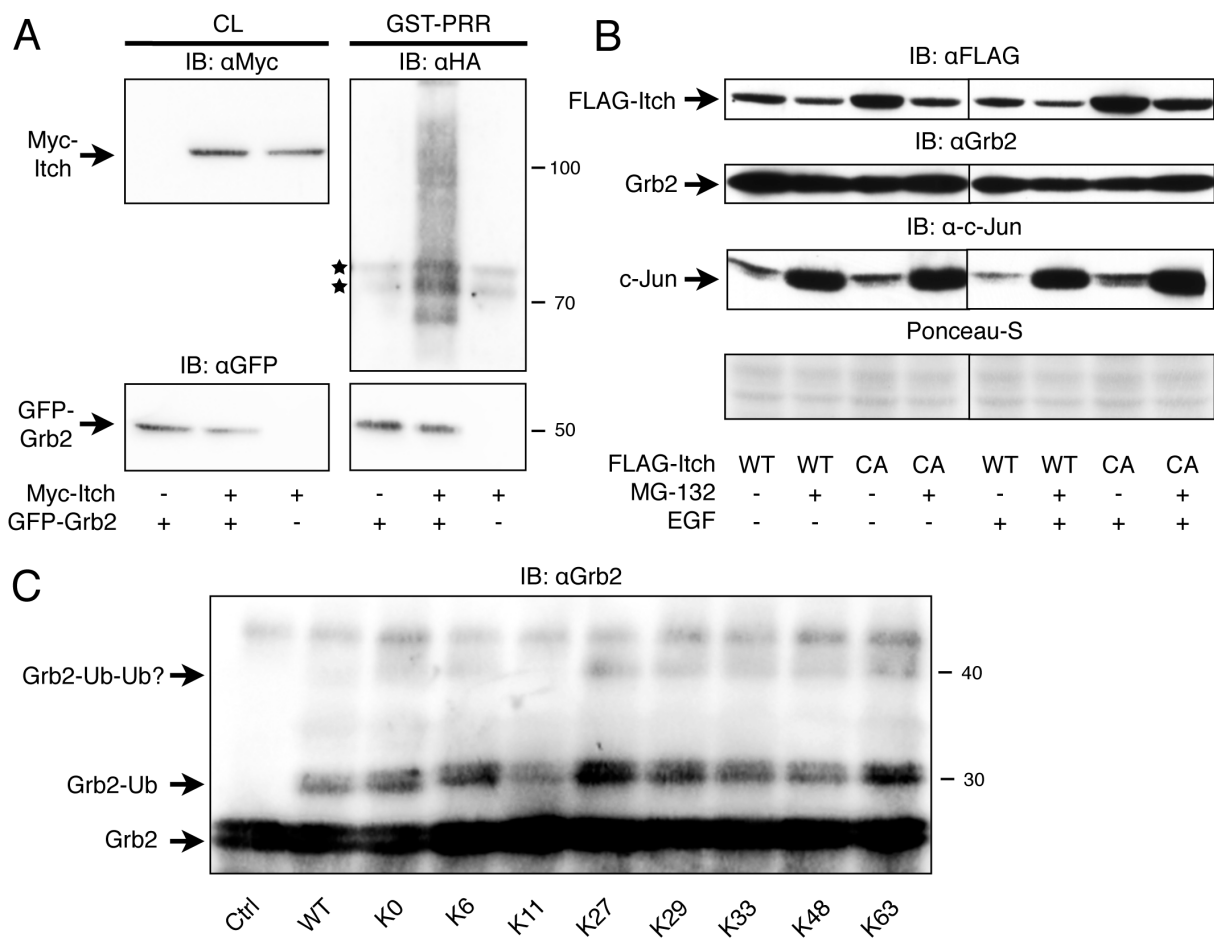
**Figure 4-2. ITC analysis of the Itch PRR-Grb2 interaction.**

A, Representative buffer subtracted ITC signals for the binding of the Itch-PRR peptide to full length Grb2 (top) and the resulting fitted binding isotherms (bottom). B, Binding parameters compiled from ITC analysis of two independent experiments.



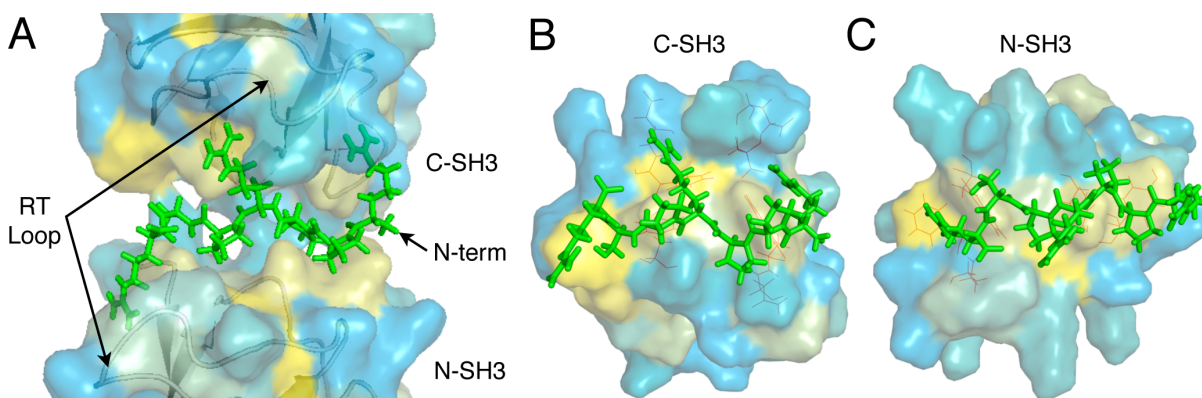
**Figure 4-3. Grb2 preferred binding motif within Itch PRR.**

A, Schematic representation of the ubiquitin ligase Itch displaying the various PRR sub-sequences used. Arginine mutations in the 249-269 peptide are indicated in red. B, Extracts from HEK-293T cells overexpressing GFP-Grb2 or from rat brains were pulled-down with the indicated GST-PRR subsequence. Immunoblot were performed with anti-GFP and anti-Grb2 to show its recuperation and content in 5% of the cell lysates (CL). C, Rat brain extracts were pulled-down as in B with the indicated GST-PRR mutants. The anti-Grb2 immunoblot shows its expression in 10% of the extracts and its retrieval by the indicated Itch R mutant in the remaining fraction.



**Figure 4-4. Non-degradative ubiquitylation of Grb2 by the ligase Itch.**

A, HEK-293T cells were transfected with HA-Ubiquitin and a combination of Myc-Itch and GFP-Grb2. Transfection efficiency was confirmed by Western blot on 10% of cell lysates (CL) with an anti-Myc antibody (top) or anti-GFP antibodies (bottom). The remaining fraction was pulled-down using GST-Itch PRR as a probe to retrieve GFP-Grb2. Its recuperation (bottom) and ubiquitylation (top) are shown on the GST-PRR panels blotted with anti-GFP or anti HA antibodies, respectively. Background level of ubiquitylation for overexpressed GFP-Grb2 was obtained by omission of Itch (first lane) and background level of endogenously expressed Grb2 ubiquitylation was obtained by omitting the GFP-Grb2 from the transfection assay (third lane). Asterisks indicate non-specific bands resulting from high protein content at these specific molecular weights. B, HEK-293T cells were transfected with either FLAG-Itch WT or its catalytically inactive mutant form where C<sub>830</sub> was substituted by an A (CA). Cells were treated as indicated with 5  $\mu$ M of MG-132 and 100 ng/ml EGF. Immunoblot was performed with the appropriate antibody to show FLAG-Itch expression and levels of Grb2 and cJun. Ponceau-S is included to show protein loading. C, *In vitro* ubiquitylation assay. Itch, Grb2 and the required enzymes were incubated together in the presence of ubiquitin (WT) or different modified ubiquitin forms where no lysine (K0) or a single specific K residue remained for chain elongation. The ligase Itch was omitted in the control experiment (Ctrl). Reactions were performed in the appropriate buffer for 2 hours at 37°C and separated by SDS-PAGE. Immunoblot was performed with an anti-Grb2 antibody to reveal the molecular weight shift caused by the addition of ubiquitin to the substrate.



**Figure 4-5. Modelling of the super SH3 complex formed between Itch PRR and Grb2 SH3s.**

FlexPepDock protocol was performed using the super SH3 structure from the Cbl- $\beta$ -PIX complex as a template. The binding interface between Itch PRR and Grb2 SH3s was modelled as detailed in the *experimental procedures*. A, The sequence RPPRPSR (residues 252-258) of the ubiquitin ligase Itch (green sticks) interacts simultaneously with both Grb2 SH3s. Hydrophobic residues are coloured yellow. B, Close-up view of the interaction between Itch PRR and Grb2 C-SH3. Residues establishing either a hydrophobic contact or a hydrogen bond with Itch PRR were defined using LigPlot and are represented as red lines. C, Representation of the complex formed with Itch PRR and Grb2 N-SH3 as in B.

## 5. Discussion

La séquence en acides aminés des différentes ligases de la famille Nedd4 montre qu'elles possèdent toutes de multiples motifs PxxP. Itch est cependant le seul membre ayant démontré la capacité à interagir avec des protéines à domaine SH3. Ces domaines se lient spécifiquement à la PRR de la ligase, qui contient une succession de motifs classiques de liaison pour les domaines SH3 au sein d'une région compacte de 20 acides aminés. La région située directement en amont du premier domaine WW de Itch n'est pas particulièrement bien conservée chez les vertébrés, à l'exception de la PRR. Ceci suggère le rôle important joué par la PRR d'Itch (1). Le but principal de ce projet est d'étudier les interactions établies par la PRR d'Itch afin de mieux comprendre les fonctions de module d'interaction. Notre laboratoire a identifié précédemment l'interaction entre Itch et l'Endophiline, une protéine impliquée dans l'endocytose contenant un domaine BAR ainsi qu'un domaine SH3 (24,81). L'interaction entre Itch et différentes protéines SH3 fut démontrée par la suite, notamment avec SNX9, SNX18,  $\beta$ -PIX, CIN85 et STAM-1 (51-53). Ces protéines sont toutes impliquées dans l'endocytose, le trafic intracellulaire et la signalisation. La PRR d'Itch pourrait donc lui permettre d'affecter ces processus en interagissant avec différentes protéines à domaine SH3. Cette étude nous a permis d'identifier et de caractériser de nouvelles interactions SH3-PRR établies par Itch. Ces travaux démontrent collectivement la versatilité de ce module de liaison. Dans cette section, nous allons donc discuter de ces nouvelles interactions du point de vue de leurs stoechiométries, de leurs affinités, de leurs préférences de liaison ainsi que leurs structures. Finalement, nous analyserons les implications de ces différentes interactions et les rôles potentiels qu'elles permettraient d'accomplir au niveau cellulaire.



## **5.1. La PRR d'Itch lui permet lier spécifiquement différentes protéines à domaine SH3**

La première partie de ce projet de recherche consistait à identifier de nouveaux partenaires potentiels liant la PRR d'Itch. Nous avons sélectionné un groupe de protéines à domaine SH3 impliqués dans l'endocytose et la signalisation cellulaire formé de Pacsine, Amphiphysine, Intersectine et Grb2. En plus de participer collectivement aux mêmes processus cellulaires, ces protéines lient plusieurs partenaires communs contenant une PRR. Nous avons donc débuté en analysant l'interaction potentielle entre Itch et ces protéines à domaine SH3 par BRET. Ces expériences nous ont permis de conclure qu'Itch colocalise *in vivo* avec différentes protéines à domaine SH3. La grande proximité entre ces molécules suggère leur interaction. Nous avons utilisé l'Endophiline dans ces expériences puisqu'elle fut identifiée précédemment comme un partenaire d'Itch par notre laboratoire (24). Parmi ces protéines, seule l'Intersectine ne présente pas un signal BRET significatif. Des essais *in vitro* par pull-down complètent les données obtenues par BRET. Ces résultats démontrent que malgré une interaction possible entre la PRR d'Itch et les domaines SH3 isolés de l'Intersectine, aucune interaction n'est observée avec la protéine complète. L'Intersectine possède une activité GEF influencée par son inhibition via une liaison intramoléculaire. Cet état n'influence toutefois pas la liaison de protéines contenant une PRR comme N-WASP (214,215). Bien qu'aucune raison évidente ne permette d'expliquer pourquoi Itch n'est pas en mesure d'interagir avec la forme complète, nos travaux démontrent clairement l'absence d'interaction entre ces protéines et l'Intersectine fut donc exclue de notre analyse. D'autre part, ces travaux ont permis d'identifier de nouvelles protéines à domaine SH3 interagissant

avec Itch. Nos essais de pull-down ont permis d'observer une interaction spécifique entre la PRR d'Itch et les domaines SH3 de Pacsine, Amphiphysine et Grb2. Itch est ainsi capable d'interagir avec la forme complète de ces protéines en plus de montrer une certaine colocalisation *in vivo*.

## **5.2. Les complexes formés avec la PRR d'Itch présentent différentes stoechiométries**

Pacsine et l'Amphiphysine possèdent, à l'instar de l'Endophiline et des SNXs, une structure similaire formée d'un domaine BAR/F-BAR et d'un domaine SH3. Il est intéressant de noter que la structure de Grb2 diffère de ces protéines en raison de la présence de deux domaines SH3 bordant chacun le domaine SH2 central. Nous avons démontré par pull-down que chacun des domaines SH3 de Grb2 sont requis afin de pouvoir lier Itch efficacement. Nous avons ensuite comparé la liaison des différentes protéines par ITC afin d'en déterminer les propriétés. Ces expériences nous ont permis d'observer trois types de complexes : un complexe super SH3 faisant intervenir les deux domaines SH3 de Grb2, un autre complexe super SH3 impliquant cette fois la liaison simultanée du domaine SH3 de deux molécules distinctes de  $\beta$ -PIX et finalement des complexes classiques présentant une stoechiométrie 1 :1.

Nos résultats suggèrent la liaison simultanée des domaines SH3 de Grb2 à Itch. Ce type d'interaction se nomme super SH3 et fut observé pour la première fois au sein de la structure de p47phox inhibée par une liaison intramoléculaire impliquant la participation de ses deux domaines SH3 (90). Différentes molécules requièrent aussi la présence des deux domaines SH3 de Grb2. Tout comme Itch, Dab2 ne peut interagir qu'avec la forme complète de Grb2 contenant ses deux domaines SH3 (261).

Nous avons observé une liaison similaire entre Itch et le domaine SH3 de  $\beta$ -PIX. Cependant,  $\beta$ -PIX ne possède qu'un domaine SH3 et cette interaction impliquerait la participation de deux protéines distinctes. La stoechiométrie de ce complexe est donc de 2 :1, en accord avec les résultats obtenus précédemment par un autre groupe (52).

Les autres protéines à domaine SH3 analysées telles que l'Endophiline, Pacsine et l'Amphiphysine lient plutôt la PRR d'Itch avec une stoechiométrie de 1 :1. Ces complexes seraient typiques de la majorité des interactions SH3-PRR en n'admettant l'interaction qu'avec un seul domaine SH3.

Les mécanismes permettant la formation de ces différentes interactions demeurent mal compris. Certains mécanismes feraient intervenir la composition du domaine SH3. Il fut suggéré qu'une séquence GWW situé dans la boucle n-Src du domaine SH3 entraîne la formation de complexes super SH3 (90). Bien que de nombreux exemples corroborent cette association, les domaines SH3 de Grb2 présentent une exception à cette règle en collaborant à la liaison d'une PRR telle que celle portée par Itch et Dab2 (84,86,223,224,261). Il semble donc que la structure du domaine SH3 ne soit pas la seule responsable de la formation de complexes super SH3. Ceci est illustré notamment par la liaison de  $\beta$ -PIX envers différentes PRR qui présente parfois un ratio de 1 :1 ou 2 :1 selon le partenaire étudié (52,84,86).

Ainsi, le peptide aurait lui aussi une certaine influence. Ce dernier va lier un des domaines SH3 comme un ligand de classe I alors que l'autre va lier en sens inverse comme un motif de classe II. Une caractéristique observée dans certains complexes super SH3 démontre une liaison symétrique impliquant deux arginines espacées entre elles et se liant à chacune des boucles RT des domaines SH3. Un résidu central chargé positivement aurait un rôle clé dans l'interaction en liant les deux domaines SH3 (86). Cependant, un tel mécanisme n'est pas

observé dans la structure que nous avons obtenu pour  $\beta$ -PIX. De plus, Itch est un exemple de PRR permettant à la fois l'établissement de complexes super SH3 ou de complexes classiques 1 :1. Il est donc évident que la nature de la PRR ne peut, à elle seule, expliquer la stoechiométrie variable.

Les mécanismes précis permettant à Itch de former des complexes avec un ratio 1 :1 ou encore super SH3 demeurent donc méconnus. Nos travaux démontrent un effet de compétition entre la liaison du domaine SH3 de  $\beta$ -PIX et celui de l'Endophiline. Ceci suggère que malgré la liaison simultanée de la PRR d'Itch par les domaines SH3 de  $\beta$ -PIX, le second domaine SH3 ne semble pas pouvoir être interchangé par un domaine SH3 de nature différente. La PRR d'Itch est donc un module de liaison versatile permettant l'établissement de complexes protéiques présentant diverses stoechiométries.

### **5.3. L'affinité de la PRR d'Itch envers différents domaines SH3 varie grandement**

Les analyses par ITC nous ont aussi permis de comparer l'affinité de ces différentes protéines à domaine SH3 envers la PRR d'Itch. Il est étonnant de constater que malgré une apparente conservation ainsi qu'une surface d'interaction similaire, le domaine SH3 de différentes protéines présentent une affinité extrêmement variable. Ainsi, la majorité des interactions SH3-PRR présentent une affinité modérée variant de 1-200  $\mu$ M (43,47).

Cependant, une poignée de domaines SH3 sont en mesure de se lier avec une très forte affinité de l'ordre du nanomolaire. La liaison de ces protéines implique généralement la liaison d'un motif atypique qui diverge des motifs de liaison classiques des SH3s (48,216-222). Nos travaux mettent en évidence une très grande variation dans l'affinité portée par la PRR d'Itch

envers différents domaines SH3 avec une préférence marquée pour l'Endophiline. L'affinité de l'Endophiline envers la PRR d'Itch se classe parmi les plus fortes mesurées parmi les complexes SH3-PRR connus à ce jour. La liaison de l'Endophiline envers d'autres PRR comme celle que contient sr-GAP3 est beaucoup moins forte (15-25  $\mu$ M) (226).

En comparaison, l'affinité d'Itch pour le domaine SH3 de  $\beta$ -PIX et Pacsine sont aussi respectivement 30 à 100 fois supérieures à celle mesurée pour l'Endophiline. Il est aussi important de noter que malgré l'interaction observée entre Itch et l'Amphiphysine à la fois *in vivo* et *in vitro*, les analyses par ITC n'ont pas permis de mesurer adéquatement l'affinité de ce complexe. Une des raisons permettant d'expliquer cette différence serait la lente précipitation de ce domaine SH3 suivant sa purification, qui interférerait avec ce type d'analyse.

Un autre fait intéressant à noter est que la liaison simultanée de deux domaines SH3 envers la PRR d'Itch présente une affinité comparable à la majorité des interactions SH3-PRR impliquant un ratio 1 :1. Ce phénomène contre-intuitif est aussi observable pour plusieurs complexes super SH3 qui présentent une affinité modérée malgré de multiples contacts établis à la fois entre les domaines SH3 de même qu'avec la PRR. Ces interactions font cependant intervenir la reconnaissance de motifs de classe I et II se chevauchant au sein de la PRR alors que les interactions les plus fortes impliquent généralement la reconnaissance de motifs atypique. Une caractérisation plus approfondie des interactions SH3-PRR présentant une affinité de l'ordre du nanomolaire permettra sans doute de mieux comprendre les mécanismes permettant l'établissement de tels complexes.

## **5.4. Préférences de liaisons des domaines SH3 envers la PRR d'Itch**

La PRR d'Itch est une région comprenant un motif de classe I ainsi que trois motifs de classe II permettant la liaison potentielle de domaines SH3. Ces motifs se chevauchent au sein d'une séquence compacte de 21 acides aminés dont les différentes portions pourraient être en mesure de lier des protéines distinctes. Dans le but d'expliquer les différences notables observées quant à l'affinité et la stoechiométrie des complexes établis par la PRR d'Itch, nous avons entrepris de comparer les préférences de liaison de ces différentes protéines. Nous avons ainsi comparé la liaison de différentes sous-séquences ou de mutants d'Itch envers ces protéines à domaine SH3. À la lumière de ces analyses nous constatons que les différents domaines SH3 ciblent la même séquence de la PRR. Cependant, l'étendue du motif de liaison ainsi que la nature spécifique des résidus impliqués peuvent varier. Ceci est en accord nos résultats démontrant une compétition entre  $\beta$ -PIX et l'Endophiline pour la liaison de la PRR d'Itch. La composition de cette région contient donc une variété de motifs permettant d'accommoder les différentes protéines à domaine SH3 avec différentes affinités.

Il est important de noter que parmi les protéines étudiées, seules l'Endophiline et Grb2 se comportent de façon identique dans nos essais de pull-down. Ceci est étonnant puisque l'affinité de ces protéines envers la PRR d'Itch varie grandement et qu'elle implique respectivement la participation d'un seul ou de deux domaines SH3. De plus, la séquence de liaison de Grb2 est relativement restreinte, ce qui renforce l'idée que la liaison de ses deux domaines SH3 implique la formation d'un complexe super SH3.

La structure des domaines SH3 présente donc une organisation similaire tout en permettant l'établissement d'une variété de complexes. L'étude des interactions SH3-PRR est en constante évolution et différents mécanismes impliqués dans leur reconnaissance furent démontrés. Une étude récente remet même en question la participation des motifs riches en prolines identifiés précédemment pour certains complexes établis par Grb2, notamment avec Sos et Cbl (235). La liaison de ces protéines implique une région plus étendue que celle anticipée, démontrant l'importance des séquences situées de part et d'autres des séquences riches en prolines. Afin de déterminer le rôle de telles séquences pour Itch, nous avons comparé la liaison de la PRR de façon isolée ou comprise dans une plus longue séquence. Ces résultats nous ont permis de conclure que la liaison des différentes protéines SH3 s'effectue exclusivement via la PRR d'Itch. Contrairement à ce qui fut observé dans le cas de la liaison de Grb2 avec Sos, les résidus bordant la PRR d'Itch n'auraient pas un impact significatif sur ses liaisons.

## **5.5. Structure et modélisation des interactions SH3-PRR**

Nos travaux démontrent une panoplie de complexes établis par la PRR d'Itch. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires permettant la liaison de cette région à différentes protéines à domaine SH3, nous avons entrepris de caractériser la structure de ces complexes par cristallographie. Nous n'avons cependant obtenus des cristaux que pour le complexe formé de la PRR avec le domaine SH3 de  $\beta$ -PIX. Il est possible que la stoechiométrie particulière de ce complexe soit un facteur déterminant dans l'obtention de cristaux, alors que la formation des autres complexes serait impossible dans ces mêmes

conditions. Bien que nous ayons tenté une multitude de conditions et de ratios différents entre ces protéines, nous n'avons pas été en mesure de déterminer leurs structures.

La structure obtenue en analysant la diffraction des cristaux Itch PRR- $\beta$ -PIX SH3 montre la présence de 6 chaînes différentes, dont deux PRR et quatre domaines SH3. La symétrie de la maille cristalline démontre deux complexes super SH3 présentant les mêmes caractéristiques générales. Cette structure en sandwich dont la PRR fait contact simultanément avec deux domaines SH3 se nomme super SH3. Ces domaines SH3 se font face et apposent ainsi leur boucle RT l'une contre l'autre, dans des orientations opposées. Le peptide placé au centre de ce complexe interagit comme un ligand de classe I envers le SH3'' et de façon similaire à un motif de classe II envers le second SH3'. Les domaines SH3 de  $\beta$ -PIX, en plus de lier la PRR, interagissent aussi entre eux via leur boucle RT respective.

La PRR d'Itch adopte envers le SH3'' une structure repliée en forme de L dont l'un des segments interagit comme motif de classe I alors que l'autre fait contact avec une face additionnelle du SH3. Cette interface est très similaire à celle obtenue précédemment (pdb : 2P4R) (52). Nos résultats démontrent cependant la liaison d'un autre SH3' et sa position par rapport au premier. Cette structure permet d'expliquer la stoechiométrie particulière de ce complexe démontrée par ITC. Cette séquence ressemble à un motif de classe II modifié (PxxPxxR) s'étendant des résidus 218 à 224. Le résidu R224 n'effectue cependant pas un contact classique avec la boucle RT, mais plutôt avec une face additionnelle du domaine SH3'. Les domaines SH3 de  $\beta$ -PIX se fixent donc principalement à une séquence symétrique RPxPPxPR (résidus 258-265) dont les résidus situés en aval (252 à 257) permettent de stabiliser le complexe en liant une face additionnelle du domaine SH3'. Contrairement à



certaines structures super SH3 impliquant Cbl, la liaison de la PRR d'Itch aux domaines SH3 de  $\beta$ -PIX ne fait pas intervenir la participation d'un résidu central chargé positivement capable d'interagir simultanément avec les deux domaines SH3 (86,224). Un tel résidu n'est cependant pas impliqué dans tous les complexes super SH3, à l'instar de celui formé entre Itch et  $\beta$ -PIX (90,223). La formation des complexes super SH3 semble donc faire intervenir différents facteurs dont nous n'avons pour le moment qu'une compréhension sommaire.

Il serait intéressant de pouvoir comparer cette structure à celle adoptée par la PRR d'Itch en complexe avec les domaines SH3 de Grb2. Tel que déterminé dans cette étude, ce complexe ferait intervenir les deux domaines SH3 d'une même molécule de Grb2 liant simultanément une séquence restreinte au sein de la PRR d'Itch. Il est cependant très difficile de purifier la forme complète de Grb2 en raison de sa grande instabilité, ce qui rend particulièrement difficile la caractérisation des interactions faisant intervenir ses deux domaines SH3. D'ailleurs, une seule structure montre la forme complète de Grb2 fut obtenue. Celle-ci correspond à un homodimère dont le domaine SH3 situé en C-terminal interagit avec le domaine SH2 d'une autre molécule de Grb2 (pdb:1GRI) (246). Afin de déterminer la structure du complexe formé entre Grb2 et la PRR d'Itch, nous avons donc procédé à de la modélisation bioinformatique. Nous avons utilisé comme matrice le complexe formé entre Cbl et  $\beta$ -PIX. Ce dernier implique la liaison d'une séquence comprenant un résidu central chargé positivement et qui présente une certaine symétrie telle que celle observée dans la séquence RPPRPSR (résidus 252-258) d'Itch ont nous avons démontré la liaison à Grb2 par pull-down. Le modèle obtenu montre cependant que l'arginine centrale R255 d'Itch ne fait contact qu'avec le domaine C-SH3 de Grb2. La chaîne latérale des arginines R252 et R258 situées aux extrémités se replie respectivement sur chacun des SH3 pour former un lien classique avec la

poche acide formée par la boucle RT. Certains contacts sont aussi observables entre les domaines SH3 notamment entre les résidus N51 et N208. Ces résidus sont situés à la fin du domaine SH3 et occupent la même position dans leur domaine respectif. Le modèle obtenu pour Grb2 représente donc une conformation plausible exploitant les différentes données obtenues pour ce complexe.

Nous avons procédé de façon similaire afin de déterminer la structure des complexes présentant un ratio 1 :1 formés entre Itch et l'Endophiline, Pacsine de même que l'Amphiphysine. Nous avons utilisé cette fois comme matrice la structure du complexe entre le domaine SH3 de  $\beta$ -PIX qui interagit avec un pseudo motif de classe II présent sur Itch. La modélisation de ces différents complexes nous a permis d'illustrer les préférences de liaisons telles que déterminées par pull-down. Ces résultats montrent une conformation plausible de l'interaction entre la PRR d'Itch et la surface principale d'interaction des domaines SH3 de ces différentes protéines. Il est intéressant de noter que parmi ces protéines, seule l'Endophiline ne lie pas le premier motif PxxP. Cette position particulière pourrait contribuer, tout comme la forme en L adoptée par la PRR, à la formation d'un complexe dont le peptide serait en mesure de faire contact avec une face additionnelle du domaine SH3. Le modèle obtenu ne présente cependant que l'interface principale et en l'absence de données cristallographiques, nous ne pouvons malheureusement que spéculer sur la forme globale que pourrait adopter un tel complexe ainsi que les raisons d'une si forte liaison.

## **5.6. Itch ubiquityle la majorité des protéines à domaine SH3 interagissant avec sa PRR**

L'activité catalytique de la ligase Itch nous a poussé à évaluer sa capacité à ubiquityler les partenaires identifiés dans cette étude. Nous avons ainsi confirmé l'ubiquitylation de l'Endophiline en plus d'observer celle de Pacsine, l'Amphiphysine et de Grb2. Ces essais montrent une trainée de bandes caractéristique de l'ajout de plusieurs molécules d'ubiquitine sur un substrat. Bien qu'une multi monoubiquitylation ne puisse être exclue, ceci suggère la formation de chaînes d'ubiquitine donc la fonction est généralement associée à la dégradation du substrat. Ces résultats correspondent à ce qui fut précédemment observé pour l'Endophiline et SNX18, deux autres substrats d'Itch (24,51,81). À l'opposé, il est surprenant de constater l'absence d'ubiquitylation de  $\beta$ -PIX dans des conditions similaires. Malgré une interaction possible entre Itch et  $\beta$ -PIX dans les cellules HEK-293T, il semble que la stoechiométrie particulière de ce complexe protéique puisse affecter sa capacité à être ubiquitylé ou encore que la présence d'autres facteurs puisse empêcher cette réaction (52,227). La sélection des substrats est un mécanisme complexe et le simple fait d'établir une interaction avec la PRR d'Itch n'est donc pas garant de son ubiquitylation.

Étant donné que Grb2 possède une structure différente de la majorité des autres substrats identifiés et que son rôle est bien connu dans l'établissement de la signalisation cellulaire, nous avons entrepris de caractériser davantage l'ubiquitylation de cette protéine. Nos travaux mettent ainsi en évidence pour la première fois une telle modification post-traductionnelle de Grb2. D'autres modifications, telles que la phosphorylation de Grb2 par différentes tyrosine kinases, furent précédemment identifiées comme ayant un impact sur la

dimérisation de Grb2 et l'établissement de la signalisation par la voie des MAPK (242). De façon similaire, la phosphorylation et la SUMOylation de Grb2 permettraient de moduler son interaction avec Sos afin de promouvoir la signalisation par les MAPK (242,244). Nous avons démontré ici l'interaction entre Itch et Grb2, qui entraîne son ubiquitylation. Nous n'avons cependant observé aucun impact significatif d'Itch sur le niveau d'expression de Grb2. Ceci suggère que l'ubiquitylation de cette protéine n'entraîne pas sa dégradation, mais permettrait plutôt d'accomplir une autre fonction. Nous avons ensuite procédé à des essais d'ubiquitylation *in vitro* afin de confirmer le type d'ubiquitylation de Grb2. Il est surprenant de constater que malgré la présence de multiples bandes d'ubiquitylation *in vivo*, nos essais *in vitro* montrent pour leur part la monoubiquitylation de cette protéine majoritairement sur une seule lysine. Ces résultats en apparence contradictoires pourraient être expliqués par la capacité que possède Itch à causer différents types d'ubiquitylation dépendamment du contexte cellulaire. L'exemple de TIEG1 supporte cette hypothèse puisqu'elle peut être mono ou polyubiquitylée par Itch. Ainsi, la monoubiquitylation de TIEG1 entrainerait sa translocation vers le noyau tandis que sa phosphorylation permettrait de contrer cet effet en promouvant la formation de chaînes d'ubiquitines liées entre elles par la lysine 27 (40,259). La fonction précise de l'ubiquitylation de Grb2 demeure une question sans réponse. On peut toutefois spéculer qu'à l'instar d'autres modifications post-traductionnelles identifiées pour Grb2, elle puisse réguler les interactions établies par cet adaptateur protéique (192,244).

## **5.7. Analyse par spectrométrie de masse des protéines à domaine SH3 liant la PRR d'Itch**

Nous avons conclu notre analyse en tentant de déterminer la variété de domaines SH3 en mesure de lier la PRR d'Itch. Ces analyses combinent un pull-down classique utilisant la PRR à de la spectrométrie de masse. Ces résultats montrent une présence marquée des différents isoformes d'Endophiline (A1-3) et d'Amphiphysine (I et II). Certains des partenaires connus ne présentent que quelques peptides dont Pacsin 1/2, SNX9/18 et Grb2.

Un groupe ressort de ces analyses et se compose de l'Endophiline, l'Amphiphysine, Pacsine et les protéines SNX. Ces protéines possèdent toutes un domaine BAR participant à la courbure des membranes à différents stades de l'endocytose en plus de leur domaine SH3. Il fut démontré dans le cas de l'Endophiline que l'activation du récepteur de l'EGF entraîne l'activation de Itch via la voie JNK. Itch augmente alors l'ubiquitylation et la dégradation l'Endophiline, ce qui affecte en retour l'internalisation des récepteurs (81). Il est possible de penser qu'Itch soient capable d'effectuer un contrôle similaire sur ces autres partenaires BAR-SH3.

Les analyses par spectrométrie de masse démontrent de nouvelles interactions potentielles entre la PRR d'Itch et différentes protéines à domaine SH3 exprimées dans le cerveau du rat. Ces protéines ont toutes un lien avec le cytosquelette. Ainsi, Src est une protéine impliquée dans les réarrangements du cytosquelette. Spectrin alpha, Cortactin, LASP1, DBNL et CD2AP sont aussi impliquées au niveau du cytosquelette d'actine (262-266). Il serait intéressant de confirmer la liaison entre Itch et ses différentes protéines afin d'évaluer l'impact d'Itch dans ces processus.

L'analyse des séquences de CD2AP, Cortactine et Dbnl montrent qu'elle contiennent toutes la séquence GWW typique de la majorité des complexes super SH3 (90). De plus, bien que la Spectrine alpha ne possède pas un tel motif, elle est aussi en mesure d'établir des complexes super SH3 (267). Il serait donc intéressant de caractériser son interaction avec Itch, étant donné la grande représentation de cette protéine dans nos analyses par spectrométrie de masse. L'analyse des différents complexes formés par la PRR d'Itch avec ces protéines à domaine SH3 permettra de mieux comprendre les mécanismes permettant la formation de complexe super SH3.

## 6. Conclusion et perspectives

Nos travaux ont permis d'identifier de nouveaux partenaires de liaison se fixant spécifiquement à la PRR d'Itch via leur domaine SH3. Il s'agit des protéines Pacsine, Amphiphysine et Grb2. Nous avons comparé les préférences de liaison de ces protéines de même que celles de partenaires connus tels que l'Endophiline et  $\beta$ -PIX envers la PRR d'Itch. Cette région est un module de liaison versatile qui peut accommoder différents SH3 avec des affinités et des stoechiométries distinctes. L'affinité d'Itch envers ces domaines SH3 varie énormément et présente une préférence marquée pour l'Endophiline. Nos travaux ont aussi permis de caractériser diverses interactions SH3-PRR additionnelles afin de mieux comprendre le rôle joué par cette région unique à Itch. Parmi les protéines interagissant avec la PRR d'Itch, Grb2 est particulièrement intéressante en raison de son rôle majeur dans l'établissement de la signalisation cellulaire et de l'endocytose. De plus, Grb2 diffère de la majorité des autres protéines à domaine SH3 interagissant avec Itch puisqu'elle ne contient pas de domaine BAR induisant la courbure des membranes. Grb2 est plutôt constituée d'une succession de modules d'interactions SH3-SH2-SH3 lui permettant d'accomplir ses fonctions. Nos travaux mettent pour la première fois en évidence l'ubiquitylation de cette protéine par Itch. Cependant, cette modification n'entraînerait pas, contrairement à d'autres substrats connus de la ligase, la dégradation de Grb2. La fonction de cette ubiquitylation demeure à ce jour inconnue, mais laisse tout de même penser qu'elle serve à réguler les interactions établies par cet adaptateur protéique.

Nous avons adressé dans cette thèse différents aspects des liaisons établies par la PRR d'Itch. Ces travaux nous ont permis de mieux apprécier la diversité des complexes formés par

cette région unique parmi les ligases de type CWH. Cette étude soulève cependant de nombreuses questions. Il serait ainsi intéressant d'évaluer le rôle joué par la PRR d'Itch *in vivo*. L'utilisation du CRISPR pourrait nous permettre de remplacer la forme sauvage d'Itch par différents mutants PRR afin d'évaluer son impact, notamment au sein de l'endocytose.

De plus, nous avons démontré que l'affinité entre Itch et l'Endophiline est de loin supérieure aux autres protéines à l'étude. Il serait donc très intéressant de déterminer la structure de ce complexe afin de comprendre les mécanismes moléculaires permettant une si grande affinité.

Finalement, nous avons démontré une nouvelle modification post-traductionnelle pour l'adaptateur Grb2. Afin d'en préciser davantage les rôles, il serait intéressant d'identifier le site d'ubiquitylation. La mutation de ce site permettra de mettre en évidence les fonctions précises jouées par cette modification. Ainsi, nous pourrions confirmer l'impact de l'ubiquitylation de Grb2 sur l'établissement de ses interactions et la signalisation cellulaire.



## Bibliographie

1. Desrochers, G., Corbeil, L., and Angers, A. (2013) From a conserved structure to regulation: CWH ubiquitin ligases tightly regulate key cellular events. *Nova Science Publishers*
2. Di Fiore, P. P., Polo, S., and Hofmann, K. (2003) When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 491-497
3. Pickart, C. M., and Fushman, D. (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 610-616
4. Nathan, J. A., Kim, H. T., Ting, L., Gygi, S. P., and Goldberg, A. L. (2013) Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes? *The EMBO journal* **32**, 552-565
5. Pickart, C. M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503-533
6. Crews, C. M. (2003) Feeding the machine: mechanisms of proteasome-catalyzed degradation of ubiquitinated proteins. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 534-539
7. Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D. (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 893-905
8. Sorkin, A., and Von Zastrow, M. (2002) Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 600-614
9. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948
10. Marin, I. (2010) Animal HECT ubiquitin ligases: evolution and functional implications. *BMC Evol Biol* **10**, 56
11. Rotin, D., and Kumar, S. (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 398-409
12. Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J. F., Pratt, J. H., Schild, L., Horisberger, J. D., Rotin, D., and Staub, O. (1999) Defective regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest* **103**, 667-673
13. Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., and Rotin, D. (1996) WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome. *The EMBO journal* **15**, 2371-2380
14. Gay, D. L., Ramon, H., and Oliver, P. M. (2008) Cbl- and Nedd4-family ubiquitin ligases: balancing tolerance and immunity. *Immunol Res* **42**, 51-64
15. Yang, T., Martin, M. L., Nielsen, J. S., Milne, K., Wall, E. M., Lin, W., Watson, P. H., and Nelson, B. H. (2009) Mammary tumors with diverse immunological phenotypes show differing sensitivity to adoptively transferred CD8<sup>+</sup> T cells lacking the Cbl-b gene. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 1865-1875
16. Perry, W. L., Hustad, C. M., Swing, D. A., O'Sullivan, T. N., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (1998) The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nat Genet* **18**, 143-146

17. Heissmeyer, V., Macian, F., Im, S. H., Varma, R., Feske, S., Venuprasad, K., Gu, H., Liu, Y. C., Dustin, M. L., and Rao, A. (2004) Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat Immunol* **5**, 255-265
18. Jennings, M. D., Blankley, R. T., Baron, M., Golovanov, A. P., and Avis, J. M. (2007) Specificity and autoregulation of Notch binding by tandem WW domains in suppressor of Deltex. *The Journal of biological chemistry* **282**, 29032-29042
19. Magnifico, A., Ettenberg, S., Yang, C., Mariano, J., Tiwari, S., Fang, S., Lipkowitz, S., and Weissman, A. M. (2003) WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation. *The Journal of biological chemistry* **278**, 43169-43177
20. Matesic, L. E., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (2008) Itchy mice: the identification of a new pathway for the development of autoimmunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **321**, 185-200
21. Matesic, L. E., Haines, D. C., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (2006) Itch genetically interacts with Notch1 in a mouse autoimmune disease model. *Hum Mol Genet* **15**, 3485-3497
22. Gao, M., Labuda, T., Xia, Y., Gallagher, E., Fang, D., Liu, Y. C., and Karin, M. (2004) Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* **306**, 271-275
23. Lohr, N. J., Molleston, J. P., Strauss, K. A., Torres-Martinez, W., Sherman, E. A., Squires, R. H., Rider, N. L., Chikwava, K. R., Cummings, O. W., Morton, D. H., and Puffenberger, E. G. (2010) Human ITCH E3 ubiquitin ligase deficiency causes syndromic multisystem autoimmune disease. *Am J Hum Genet* **86**, 447-453
24. Angers, A., Ramjaun, A. R., and McPherson, P. S. (2004) The HECT domain ligase itch ubiquitinates endophilin and localizes to the trans-Golgi network and endosomal system. *The Journal of biological chemistry* **279**, 11471-11479
25. Plant, P. J., Yeger, H., Staub, O., Howard, P., and Rotin, D. (1997) The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent plasma membrane localization. *The Journal of biological chemistry* **272**, 32329-32336
26. Wang, G., McCaffery, J. M., Wendland, B., Dupre, S., Haguenauer-Tsapis, R., and Huibregtse, J. M. (2001) Localization of the Rsp5p ubiquitin-protein ligase at multiple sites within the endocytic pathway. *Molecular and cellular biology* **21**, 3564-3575
27. Cho, W., and Stahelin, R. V. (2006) Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 838-849
28. Cho, W. (2001) Membrane targeting by C1 and C2 domains. *The Journal of biological chemistry* **276**, 32407-32410
29. Eaton, H. E., Desrochers, G., Drory, S. B., Metcalf, J., Angers, A., and Brunetti, C. R. (2011) SIMPLE/LITAF expression induces the translocation of the ubiquitin ligase itch towards the lysosomal compartments. *PloS one* **6**, e16873
30. Ingham, R. J., Colwill, K., Howard, C., Dettwiler, S., Lim, C. S., Yu, J., Hersi, K., Raaijmakers, J., Gish, G., Mbamalu, G., Taylor, L., Yeung, B., Vassilovski, G., Amin, M., Chen, F., Matskova, L., Winberg, G., Ernberg, I., Linding, R., O'Donnell, P., Starostine, A., Keller, W., Metalnikov, P., Stark, C., and Pawson, T. (2005) WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks. *Molecular and cellular biology* **25**, 7092-7106

31. Kay, B. K., Williamson, M. P., and Sudol, M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* **14**, 231-241
32. Kofler, M. M., and Freund, C. (2006) The GYF domain. *The FEBS journal* **273**, 245-256
33. Sudol, M., and Hunter, T. (2000) NeW wrinkles for an old domain. *Cell* **103**, 1001-1004
34. Fotia, A. B., Dinudom, A., Shearwin, K. E., Koch, J. P., Korbmacher, C., Cook, D. I., and Kumar, S. (2003) The role of individual Nedd4-2 (KIAA0439) WW domains in binding and regulating epithelial sodium channels. *FASEB J* **17**, 70-72
35. Zhang, W., Na, T., Wu, G., Jing, H., and Peng, J. B. (2010) Down-regulation of intestinal apical calcium entry channel TRPV6 by ubiquitin E3 ligase Nedd4-2. *The Journal of biological chemistry* **285**, 36586-36596
36. Ingham, R. J., Gish, G., and Pawson, T. (2004) The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* **23**, 1972-1984
37. Maspero, E., Mari, S., Valentini, E., Musacchio, A., Fish, A., Pasqualato, S., and Polo, S. (2011) Structure of the HECT:ubiquitin complex and its role in ubiquitin chain elongation. *EMBO reports* **12**, 342-349
38. Wei, W., Li, M., Wang, J., Nie, F., and Li, L. (2012) The E3 ubiquitin ligase ITCH negatively regulates canonical Wnt signaling by targeting dishevelled protein. *Molecular and cellular biology* **32**, 3903-3912
39. Chastagner, P., Israel, A., and Brou, C. (2006) Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO reports* **7**, 1147-1153
40. Peng, D. J., Zeng, M., Muromoto, R., Matsuda, T., Shimoda, K., Subramaniam, M., Spelsberg, T. C., Wei, W. Z., and Venuprasad, K. (2011) Noncanonical K27-linked polyubiquitination of TIEG1 regulates Foxp3 expression and tumor growth. *J Immunol* **186**, 5638-5647
41. Scialpi, F., Malatesta, M., Peschiaroli, A., Rossi, M., Melino, G., and Bernassola, F. (2008) Itch self-polyubiquitylation occurs through lysine-63 linkages. *Biochem Pharmacol* **76**, 1515-1521
42. Sheng, Y., Hong, J. H., Doherty, R., Srikumar, T., Shloush, J., Avvakumov, G. V., Walker, J. R., Xue, S., Neculai, D., Wan, J. W., Kim, S. K., Arrowsmith, C. H., Raught, B., and Dhe-Paganon, S. (2012) A human ubiquitin conjugating enzyme (E2)-HECT E3 ligase structure-function screen. *Mol Cell Proteomics* **11**, 329-341
43. Mayer, B. J. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *Journal of cell science* **114**, 1253-1263
44. Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. (1993) Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**, 1157-1161
45. Lim, W. A., Richards, F. M., and Fox, R. O. (1994) Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* **372**, 375-379
46. Saksela, K., and Permi, P. (2012) SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS letters* **586**, 2609-2614

47. Li, S. S. (2005) Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *The Biochemical journal* **390**, 641-653
48. Aitio, O., Hellman, M., Kazlauskas, A., Vingadassalom, D. F., Leong, J. M., Saksela, K., and Permi, P. (2010) Recognition of tandem PxxP motifs as a unique Src homology 3-binding mode triggers pathogen-driven actin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21743-21748
49. Aki, D., Zhang, W., and Liu, Y. C. (2015) The E3 ligase Itch in immune regulation and beyond. *Immunol Rev* **266**, 6-26
50. Melino, G., Gallagher, E., Aqeilan, R. I., Knight, R., Peschiaroli, A., Rossi, M., Scialpi, F., Malatesta, M., Zocchi, L., Browne, G., Ciechanover, A., and Bernassola, F. (2008) Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ* **15**, 1103-1112
51. Baumann, C., Lindholm, C. K., Rimoldi, D., and Levy, F. (2010) The E3 ubiquitin ligase Itch regulates sorting nexin 9 through an unconventional substrate recognition domain. *The FEBS journal* **277**, 2803-2814
52. Janz, J. M., Sakmar, T. P., and Min, K. C. (2007) A novel interaction between atrophin-interacting protein 4 and beta-p21-activated kinase-interactive exchange factor is mediated by an SH3 domain. *The Journal of biological chemistry* **282**, 28893-28903
53. Malik, R., Soh, U. J., Trejo, J., and Marchese, A. (2012) Novel roles for the E3 ubiquitin ligase atrophin-interacting protein 4 and signal transduction adaptor molecule 1 in G protein-coupled receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* **287**, 9013-9027
54. Agrawal, V., and Kishan, R. K. (2001) Functional evolution of two subtly different (similar) folds. *BMC Struct Biol* **1**, 5
55. Ringstad, N., Nemoto, Y., and De Camilli, P. (1997) The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 8569-8574
56. Modregger, J., Schmidt, A. A., Ritter, B., Huttner, W. B., and Plomann, M. (2003) Characterization of Endophilin B1b, a brain-specific membrane-associated lysophosphatidic acid acyl transferase with properties distinct from endophilin A1. *The Journal of biological chemistry* **278**, 4160-4167
57. Karbowski, M., Jeong, S. Y., and Youle, R. J. (2004) Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol* **166**, 1027-1039
58. Runkle, K. B., Meyerkord, C. L., Desai, N. V., Takahashi, Y., and Wang, H. G. (2012) Bif-1 suppresses breast cancer cell migration by promoting EGFR endocytic degradation. *Cancer Biol Ther* **13**, 956-966
59. He, S., Ni, D., Ma, B., Lee, J. H., Zhang, T., Ghosalli, I., Pirooz, S. D., Zhao, Z., Bharatham, N., Li, B., Oh, S., Lee, W. H., Takahashi, Y., Wang, H. G., Minassian, A., Feng, P., Deretic, V., Pepperkok, R., Tagaya, M., Yoon, H. S., and Liang, C. (2013) PtdIns(3)P-bound UVRAG coordinates Golgi-ER retrograde and Atg9 transport by differential interactions with the ER tether and the beclin 1 complex. *Nature cell biology* **15**, 1206-1219

60. Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H. D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J. U., Cheng, J. Q., Mule, J. J., Pledger, W. J., and Wang, H. G. (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature cell biology* **9**, 1142-1151
61. Takahashi, Y., Hori, T., Cooper, T. K., Liao, J., Desai, N., Serfass, J. M., Young, M. M., Park, S., Izu, Y., and Wang, H. G. (2013) Bif-1 haploinsufficiency promotes chromosomal instability and accelerates Myc-driven lymphomagenesis via suppression of mitophagy. *Blood* **121**, 1622-1632
62. Takahashi, Y., Meyerkord, C. L., Hori, T., Runkle, K., Fox, T. E., Kester, M., Loughran, T. P., and Wang, H. G. (2011) Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy* **7**, 61-73
63. Takahashi, Y., Tsotakos, N., Liu, Y., Young, M. M., Serfass, J., Tang, Z., Abraham, T., and Wang, H. G. (2016) The Bif-1-Dynamin 2 membrane fission machinery regulates Atg9-containing vesicle generation at the Rab11-positive reservoirs. *Oncotarget*
64. Wong, A. S., Lee, R. H., Cheung, A. Y., Yeung, P. K., Chung, S. K., Cheung, Z. H., and Ip, N. Y. (2011) Cdk5-mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of Parkinson's disease. *Nature cell biology* **13**, 568-579
65. Vannier, C., Pesty, A., San-Roman, M. J., and Schmidt, A. A. (2013) The Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein endophilin B2 interacts with plectin and controls perinuclear cytoskeletal architecture. *The Journal of biological chemistry* **288**, 27619-27637
66. Loebrich, S., Benoit, M. R., Konopka, J. A., Cottrell, J. R., Gibson, J., and Nedivi, E. (2016) CPG2 Recruits Endophilin B2 to the Cytoskeleton for Activity-Dependent Endocytosis of Synaptic Glutamate Receptors. *Current biology : CB* **26**, 296-308
67. Daumke, O., Roux, A., and Haucke, V. (2014) BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission. *Cell* **156**, 882-892
68. Ferguson, S. M., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., Destaing, O., Ko, G., Takasaki, J., Cremona, O., E, O. T., and De Camilli, P. (2009) Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell* **17**, 811-822
69. Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Ohki, T., Mori, H., Kamioka, Y., and Mochizuki, N. (2006) Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *The EMBO journal* **25**, 2889-2897
70. Mim, C., Cui, H., Gawronski-Salerno, J. A., Frost, A., Lyman, E., Voth, G. A., and Unger, V. M. (2012) Structural basis of membrane bending by the N-BAR protein endophilin. *Cell* **149**, 137-145
71. Cestra, G., Castagnoli, L., Dente, L., Minenkova, O., Petrelli, A., Migone, N., Hoffmuller, U., Schneider-Mergener, J., and Cesareni, G. (1999) The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity. *The Journal of biological chemistry* **274**, 32001-32007
72. Tian, Q., Zhang, J. F., Fan, J., Song, Z., and Chen, Y. (2012) Endophilin isoforms have distinct characteristics in interactions with N-type Ca<sup>2+</sup> channels and dynamin I. *Neurosci Bull* **28**, 483-492

73. Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K., and De Camilli, P. (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol* **155**, 193-200
74. Trempe, J. F., Chen, C. X., Grenier, K., Camacho, E. M., Kozlov, G., McPherson, P. S., Gehring, K., and Fon, E. A. (2009) SH3 domains from a subset of BAR proteins define a Ubl-binding domain and implicate parkin in synaptic ubiquitination. *Molecular cell* **36**, 1034-1047
75. Gad, H., Ringstad, N., Low, P., Kjaerulff, O., Gustafsson, J., Wenk, M., Di Paolo, G., Nemoto, Y., Crun, J., Ellisman, M. H., De Camilli, P., Shupliakov, O., and Brodin, L. (2000) Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron* **27**, 301-312
76. Ringstad, N., Gad, H., Low, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O., and De Camilli, P. (1999) Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **24**, 143-154
77. Simpson, F., Hussain, N. K., Qualmann, B., Kelly, R. B., Kay, B. K., McPherson, P. S., and Schmid, S. L. (1999) SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nature cell biology* **1**, 119-124
78. Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N., and Giordano, S. (2002) The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* **416**, 187-190
79. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., and Dikic, I. (2002) Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* **416**, 183-187
80. Huang, F., and Sorkin, A. (2005) Growth factor receptor binding protein 2-mediated recruitment of the RING domain of Cbl to the epidermal growth factor receptor is essential and sufficient to support receptor endocytosis. *Molecular biology of the cell* **16**, 1268-1281
81. Azakir, B. A., and Angers, A. (2009) Reciprocal regulation of the ubiquitin ligase Itch and the epidermal growth factor receptor signaling. *Cellular signalling* **21**, 1326-1336
82. Boucrot, E., Ferreira, A. P., Almeida-Souza, L., Debar, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnet, N., and McMahon, H. T. (2015) Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* **517**, 460-465
83. Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J. L., Premont, R. T., Taylor, S. J., and Cerione, R. A. (1999) A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* **274**, 22393-22400
84. Hoelz, A., Janz, J. M., Lawrie, S. D., Corwin, B., Lee, A., and Sakmar, T. P. (2006) Crystal structure of the SH3 domain of betaPIX in complex with a high affinity peptide from PAK2. *Journal of molecular biology* **358**, 509-522
85. Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T., and Lim, L. (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Molecular cell* **1**, 183-192
86. Jozic, D., Cardenes, N., Deribe, Y. L., Moncalian, G., Hoeller, D., Groemping, Y., Dikic, I., Rittinger, K., and Bravo, J. (2005) Cbl promotes clustering of endocytic adaptor proteins. *Nature structural & molecular biology* **12**, 972-979

87. Feng, Q., Baird, D., Peng, X., Wang, J., Ly, T., Guan, J. L., and Cerione, R. A. (2006) Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth. *Nature cell biology* **8**, 945-956
88. Schmidt, M. H., Husnjak, K., Szymkiewicz, I., Haglund, K., and Dikic, I. (2006) Cbl escapes Cdc42-mediated inhibition by downregulation of the adaptor molecule betaPix. *Oncogene* **25**, 3071-3078
89. Wu, W. J., Tu, S., and Cerione, R. A. (2003) Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation. *Cell* **114**, 715-725
90. Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S. J., and Rittinger, K. (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* **113**, 343-355
91. Cullen, P. J. (2008) Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 574-582
92. Lundmark, R., and Carlsson, S. R. (2009) SNX9 - a prelude to vesicle release. *Journal of cell science* **122**, 5-11
93. Haberg, K., Lundmark, R., and Carlsson, S. R. (2008) SNX18 is an SNX9 paralog that acts as a membrane tubulator in AP-1-positive endosomal trafficking. *Journal of cell science* **121**, 1495-1505
94. Alto, N. M., Weflen, A. W., Rardin, M. J., Yazar, D., Lazar, C. S., Tonikian, R., Koller, A., Taylor, S. S., Boone, C., Sidhu, S. S., Schmid, S. L., Hecht, G. A., and Dixon, J. E. (2007) The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways. *J Cell Biol* **178**, 1265-1278
95. Soulet, F., Yazar, D., Leonard, M., and Schmid, S. L. (2005) SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Molecular biology of the cell* **16**, 2058-2067
96. Lin, Q., Lo, C. G., Cerione, R. A., and Yang, W. (2002) The Cdc42 target ACK2 interacts with sorting nexin 9 (SH3PX1) to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 10134-10138
97. Yeow-Fong, L., Lim, L., and Manser, E. (2005) SNX9 as an adaptor for linking synaptojanin-1 to the Cdc42 effector ACK1. *FEBS letters* **579**, 5040-5048
98. Park, J., Kim, Y., Lee, S., Park, J. J., Park, Z. Y., Sun, W., Kim, H., and Chang, S. (2010) SNX18 shares a redundant role with SNX9 and modulates endocytic trafficking at the plasma membrane. *Journal of cell science* **123**, 1742-1750
99. Bache, K. G., Raiborg, C., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003) STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *The Journal of biological chemistry* **278**, 12513-12521
100. Goh, L. K., and Sorkin, A. (2013) Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a017459
101. Berlin, I., Schwartz, H., and Nash, P. D. (2010) Regulation of epidermal growth factor receptor ubiquitination and trafficking by the USP8.STAM complex. *The Journal of biological chemistry* **285**, 34909-34921
102. Sierra, M. I., Wright, M. H., and Nash, P. D. (2010) AMSH interacts with ESCRT-0 to regulate the stability and trafficking of CXCR4. *The Journal of biological chemistry* **285**, 13990-14004

103. Mizuno, E., Kobayashi, K., Yamamoto, A., Kitamura, N., and Komada, M. (2006) A deubiquitinating enzyme UBPY regulates the level of protein ubiquitination on endosomes. *Traffic* **7**, 1017-1031
104. Urbe, S., McCullough, J., Row, P., Prior, I. A., Welchman, R., and Clague, M. J. (2006) Control of growth factor receptor dynamics by reversible ubiquitination. *Biochem Soc Trans* **34**, 754-756
105. Bowers, K., Piper, S. C., Edeling, M. A., Gray, S. R., Owen, D. J., Lehner, P. J., and Luzio, J. P. (2006) Degradation of endocytosed epidermal growth factor and virally ubiquitinated major histocompatibility complex class I is independent of mammalian ESCRTII. *The Journal of biological chemistry* **281**, 5094-5105
106. McCullough, J., Row, P. E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M. J., and Urbe, S. (2006) Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Current biology : CB* **16**, 160-165
107. Bhandari, D., Robia, S. L., and Marchese, A. (2009) The E3 ubiquitin ligase atrophin interacting protein 4 binds directly to the chemokine receptor CXCR4 via a novel WW domain-mediated interaction. *Molecular biology of the cell* **20**, 1324-1339
108. Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J. H., Stenmark, H., and Benovic, J. L. (2003) The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell* **5**, 709-722
109. Drouet, V., and Lesage, S. (2014) Synaptojanin 1 mutation in Parkinson's disease brings further insight into the neuropathological mechanisms. *Biomed Res Int* **2014**, 289728
110. McPherson, P. S., Garcia, E. P., Slepnev, V. I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W. S., Bauerfeind, R., Nemoto, Y., and De Camilli, P. (1996) A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* **379**, 353-357
111. Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R., Luthi, A., Kim, W. T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S. B., Flavell, R. A., McCormick, D. A., and De Camilli, P. (1999) Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **99**, 179-188
112. Guo, S., Stolz, L. E., Lemrow, S. M., and York, J. D. (1999) SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *The Journal of biological chemistry* **274**, 12990-12995
113. Mani, M., Lee, S. Y., Lucast, L., Cremona, O., Di Paolo, G., De Camilli, P., and Ryan, T. A. (2007) The dual phosphatase activity of synaptojanin1 is required for both efficient synaptic vesicle endocytosis and reavailability at nerve terminals. *Neuron* **56**, 1004-1018
114. Zucconi, A., Dente, L., Santonico, E., Castagnoli, L., and Cesareni, G. (2001) Selection of ligands by panning of domain libraries displayed on phage lambda reveals new potential partners of synaptojanin 1. *Journal of molecular biology* **307**, 1329-1339
115. Evergren, E., Gad, H., Walther, K., Sundborger, A., Tomilin, N., and Shupliakov, O. (2007) Intersectin is a negative regulator of dynamin recruitment to the synaptic endocytic zone in the central synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 379-390



116. Pechstein, A., Shupliakov, O., and Haucke, V. (2010) Intersectin 1: a versatile actor in the synaptic vesicle cycle. *Biochem Soc Trans* **38**, 181-186
117. de Heuvel, E., Bell, A. W., Ramjaun, A. R., Wong, K., Sossin, W. S., and McPherson, P. S. (1997) Identification of the major synaptojanin-binding proteins in brain. *The Journal of biological chemistry* **272**, 8710-8716
118. Milosevic, I., Giovedi, S., Lou, X., Raimondi, A., Collesi, C., Shen, H., Paradise, S., O'Toole, E., Ferguson, S., Cremona, O., and De Camilli, P. (2011) Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron* **72**, 587-601
119. Verstreken, P., Koh, T. W., Schulze, K. L., Zhai, R. G., Hiesinger, P. R., Zhou, Y., Mehta, S. Q., Cao, Y., Roos, J., and Bellen, H. J. (2003) Synaptojanin is recruited by endophilin to promote synaptic vesicle uncoating. *Neuron* **40**, 733-748
120. Bai, J., Hu, Z., Dittman, J. S., Pym, E. C., and Kaplan, J. M. (2010) Endophilin functions as a membrane-bending molecule and is delivered to endocytic zones by exocytosis. *Cell* **143**, 430-441
121. Dong, Y., Gou, Y., Li, Y., Liu, Y., and Bai, J. (2015) Synaptojanin cooperates in vivo with endophilin through an unexpected mechanism. *Elife* **4**
122. Nemoto, Y., Arribas, M., Haffner, C., and DeCamilli, P. (1997) Synaptojanin 2, a novel synaptojanin isoform with a distinct targeting domain and expression pattern. *The Journal of biological chemistry* **272**, 30817-30821
123. Kim, W. T., Chang, S., Daniell, L., Cremona, O., Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2002) Delayed reentry of recycling vesicles into the fusion-competent synaptic vesicle pool in synaptojanin 1 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 17143-17148
124. Rusk, N., Le, P. U., Mariggio, S., Guay, G., Lurisci, C., Nabi, I. R., Corda, D., and Symons, M. (2003) Synaptojanin 2 functions at an early step of clathrin-mediated endocytosis. *Current biology : CB* **13**, 659-663
125. Cao, H., Garcia, F., and McNiven, M. A. (1998) Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Molecular biology of the cell* **9**, 2595-2609
126. Ferguson, S. M., Brasnjo, G., Hayashi, M., Wolfel, M., Collesi, C., Giovedi, S., Raimondi, A., Gong, L. W., Ariel, P., Paradise, S., O'Toole, E., Flavell, R., Cremona, O., Miesenbock, G., Ryan, T. A., and De Camilli, P. (2007) A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science* **316**, 570-574
127. Gray, N. W., Fourgeaud, L., Huang, B., Chen, J., Cao, H., Oswald, B. J., Hemar, A., and McNiven, M. A. (2003) Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with mGluR5 and Homer. *Current biology : CB* **13**, 510-515
128. Raimondi, A., Ferguson, S. M., Lou, X., Armbruster, M., Paradise, S., Giovedi, S., Messa, M., Kono, N., Takasaki, J., Cappello, V., O'Toole, E., Ryan, T. A., and De Camilli, P. (2011) Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **70**, 1100-1114
129. Morlot, S., and Roux, A. (2013) Mechanics of dynamin-mediated membrane fission. *Annu Rev Biophys* **42**, 629-649
130. Sandvig, K., Pust, S., Skotland, T., and van Deurs, B. (2011) Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 413-420

131. Okamoto, P. M., Herskovits, J. S., and Vallee, R. B. (1997) Role of the basic, proline-rich region of dynamin in Src homology 3 domain binding and endocytosis. *The Journal of biological chemistry* **272**, 11629-11635
132. Itoh, T., Erdmann, K. S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., and De Camilli, P. (2005) Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell* **9**, 791-804
133. Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M., and Plomann, M. (2000) All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *Journal of cell science* **113 Pt 24**, 4511-4521
134. Suetsugu, S., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2014) Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins. *Physiol Rev* **94**, 1219-1248
135. Ramjaun, A. R., Micheva, K. D., Bouchelet, I., and McPherson, P. S. (1997) Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *The Journal of biological chemistry* **272**, 16700-16706
136. Ramjaun, A. R., and McPherson, P. S. (1998) Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *Journal of neurochemistry* **70**, 2369-2376
137. Butler, M. H., David, C., Ochoa, G. C., Freyberg, Z., Daniell, L., Grabs, D., Cremona, O., and De Camilli, P. (1997) Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol* **137**, 1355-1367
138. Di Paolo, G., Sankaranarayanan, S., Wenk, M. R., Daniell, L., Perucco, E., Caldarone, B. J., Flavell, R., Picciotto, M. R., Ryan, T. A., Cremona, O., and De Camilli, P. (2002) Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron* **33**, 789-804
139. Ramjaun, A. R., Philie, J., de Heuvel, E., and McPherson, P. S. (1999) The N terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *The Journal of biological chemistry* **274**, 19785-19791
140. Muller, A. J., Baker, J. F., DuHadaway, J. B., Ge, K., Farmer, G., Donover, P. S., Meade, R., Reid, C., Grzanna, R., Roach, A. H., Shah, N., Soler, A. P., and Prendergast, G. C. (2003) Targeted disruption of the murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. *Molecular and cellular biology* **23**, 4295-4306
141. Slepnev, V. I., Ochoa, G. C., Butler, M. H., and De Camilli, P. (2000) Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *The Journal of biological chemistry* **275**, 17583-17589
142. Evergren, E., Marcucci, M., Tomilin, N., Low, P., Slepnev, V., Andersson, F., Gad, H., Brodin, L., De Camilli, P., and Shupliakov, O. (2004) Amphiphysin is a component of clathrin coats formed during synaptic vesicle recycling at the lamprey giant synapse. *Traffic* **5**, 514-528
143. Micheva, K. D., Ramjaun, A. R., Kay, B. K., and McPherson, P. S. (1997) SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin. *FEBS letters* **414**, 308-312

144. Farsad, K., Slepnev, V., Ochoa, G., Daniell, L., Haucke, V., and De Camilli, P. (2003) A putative role for intramolecular regulatory mechanisms in the adaptor function of amphiphysin in endocytosis. *Neuropharmacology* **45**, 787-796
145. Rao, Y., and Haucke, V. (2011) Membrane shaping by the Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein superfamily. *Cell Mol Life Sci* **68**, 3983-3993
146. Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V., and De Camilli, P. (1999) Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nature cell biology* **1**, 33-39
147. Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495-499
148. Yoshida, Y., and Takei, K. (2005) Stimulation of dynamin GTPase activity by amphiphysin. *Methods Enzymol* **404**, 528-537
149. Yamada, H., Ohashi, E., Abe, T., Kusumi, N., Li, S. A., Yoshida, Y., Watanabe, M., Tomizawa, K., Kashiwakura, Y., Kumon, H., Matsui, H., and Takei, K. (2007) Amphiphysin 1 is important for actin polymerization during phagocytosis. *Molecular biology of the cell* **18**, 4669-4680
150. Yamada, H., Padilla-Parra, S., Park, S. J., Itoh, T., Chaineau, M., Monaldi, I., Cremona, O., Benfenati, F., De Camilli, P., Coppey-Moisand, M., Tramier, M., Galli, T., and Takei, K. (2009) Dynamic interaction of amphiphysin with N-WASP regulates actin assembly. *The Journal of biological chemistry* **284**, 34244-34256
151. Predescu, S. A., Predescu, D. N., Timblin, B. K., Stan, R. V., and Malik, A. B. (2003) Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells. *Molecular biology of the cell* **14**, 4997-5010
152. Tsyba, L. O., Dergai, M. V., Skrypka, I. Y., Nikolaienko, O. V., Dergai, O. V., Kropyvko, S. V., Novokhatska, O. V., Morderer, D. Y., Gryaznova, T. A., Gubar, O. S., and Rynditch, A. V. (2013) ITSN protein family: Regulation of diversity, role in signalling and pathology. *Biopolymers and Cell* **29**, 244-251
153. Guipponi, M., Scott, H. S., Chen, H., Schebesta, A., Rossier, C., and Antonarakis, S. E. (1998) Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon. *Genomics* **53**, 369-376
154. Pucharcos, C., Estivill, X., and de la Luna, S. (2000) Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. *FEBS letters* **478**, 43-51
155. Novokhatska, O., Dergai, M., Tsyba, L., Skrypka, I., Filonenko, V., Moreau, J., and Rynditch, A. (2013) Adaptor proteins intersectin 1 and 2 bind similar proline-rich ligands but are differentially recognized by SH2 domain-containing proteins. *PloS one* **8**, e70546
156. Chen, H., Fre, S., Slepnev, V. I., Capua, M. R., Takei, K., Butler, M. H., Di Fiore, P. P., and De Camilli, P. (1998) Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* **394**, 793-797
157. Sengar, A. S., Wang, W., Bishay, J., Cohen, S., and Egan, S. E. (1999) The EH and SH3 domain Eps proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. *The EMBO journal* **18**, 1159-1171
158. Yamabhai, M., Hoffman, N. G., Hardison, N. L., McPherson, P. S., Castagnoli, L., Cesareni, G., and Kay, B. K. (1998) Intersectin, a novel adaptor protein with two

- Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *The Journal of biological chemistry* **273**, 31401-31407
159. Henne, W. M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., and McMahon, H. T. (2010) FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* **328**, 1281-1284
  160. Wong, K. A., Wilson, J., Russo, A., Wang, L., Okur, M. N., Wang, X., Martin, N. P., Scappini, E., Carnegie, G. K., and O'Bryan, J. P. (2012) Intersectin (ITSN) family of scaffolds function as molecular hubs in protein interaction networks. *PloS one* **7**, e36023
  161. Adams, A., Thorn, J. M., Yamabhai, M., Kay, B. K., and O'Bryan, J. P. (2000) Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* **275**, 27414-27420
  162. Bardita, C., Predescu, D., and Predescu, S. (2013) Long-term silencing of intersectin-1s in mouse lungs by repeated delivery of a specific siRNA via cationic liposomes. Evaluation of knockdown effects by electron microscopy. *J Vis Exp*
  163. Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514
  164. Tong, X. K., Hussain, N. K., Adams, A. G., O'Bryan, J. P., and McPherson, P. S. (2000) Intersectin can regulate the Ras/MAP kinase pathway independent of its role in endocytosis. *The Journal of biological chemistry* **275**, 29894-29899
  165. Martin, N. P., Mohny, R. P., Dunn, S., Das, M., Scappini, E., and O'Bryan, J. P. (2006) Intersectin regulates epidermal growth factor receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling. *Molecular pharmacology* **70**, 1643-1653
  166. Okur, M. N., Ooi, J., Fong, C. W., Martinez, N., Garcia-Dominguez, C., Rojas, J. M., Guy, G., and O'Bryan, J. P. (2012) Intersectin 1 enhances Cbl ubiquitylation of epidermal growth factor receptor through regulation of Sprouty2-Cbl interaction. *Molecular and cellular biology* **32**, 817-825
  167. Okur, M. N., Russo, A., and O'Bryan, J. P. (2014) Receptor tyrosine kinase ubiquitylation involves the dynamic regulation of Cbl-Spry2 by intersectin 1 and the Shp2 tyrosine phosphatase. *Molecular and cellular biology* **34**, 271-279
  168. Hussain, N. K., Jenna, S., Glogauer, M., Quinn, C. C., Wasiak, S., Guipponi, M., Antonarakis, S. E., Kay, B. K., Stossel, T. P., Lamarche-Vane, N., and McPherson, P. S. (2001) Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nature cell biology* **3**, 927-932
  169. Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* **70**, 649-676
  170. Rohatgi, R., Ho, H. Y., and Kirschner, M. W. (2000) Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* **150**, 1299-1310
  171. Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., Way, M., and Bader, M. F. (2004) Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Molecular biology of the cell* **15**, 520-531
  172. Gubar, O., Morderer, D., Tsyba, L., Croise, P., Houy, S., Ory, S., Gasman, S., and Rynditch, A. (2013) Intersectin: The Crossroad between Vesicle Exocytosis and Endocytosis. *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**, 109

173. Okamoto, M., Schoch, S., and Sudhof, T. C. (1999) EHS1/intersectin, a protein that contains EH and SH3 domains and binds to dynamin and SNAP-25. A protein connection between exocytosis and endocytosis? *The Journal of biological chemistry* **274**, 18446-18454
174. Friesland, A., Zhao, Y., Chen, Y. H., Wang, L., Zhou, H., and Lu, Q. (2013) Small molecule targeting Cdc42-intersectin interaction disrupts Golgi organization and suppresses cell motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 1261-1266
175. Morderer, D., Nikolaenko, O., Skrypkina, I., Cherkas, V., Tsyba, L., Belan, P., and Rynditch, A. (2012) Endocytic adaptor protein intersectin 1 forms a complex with microtubule stabilizer STOP in neurons. *Gene* **505**, 360-364
176. Halbach, A., Morgelin, M., Baumgarten, M., Milbrandt, M., Paulsson, M., and Plomann, M. (2007) PACSIN 1 forms tetramers via its N-terminal F-BAR domain. *The FEBS journal* **274**, 773-782
177. Qualmann, B., and Kelly, R. B. (2000) Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J Cell Biol* **148**, 1047-1062
178. Sumoy, L., Pluvinet, R., Andreu, N., Estivill, X., and Escarceller, M. (2001) PACSIN 3 is a novel SH3 domain cytoplasmic adapter protein of the pacsin-syndapin-FAP52 gene family. *Gene* **262**, 199-205
179. Goh, S. L., Wang, Q., Byrnes, L. J., and Sondermann, H. (2012) Versatile membrane deformation potential of activated pacsin. *PloS one* **7**, e51628
180. Dharmalingam, E., Haeckel, A., Pinyol, R., Schwintzer, L., Koch, D., Kessels, M. M., and Qualmann, B. (2009) F-BAR proteins of the syndapin family shape the plasma membrane and are crucial for neuromorphogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 13315-13327
181. Wasiak, S., Quinn, C. C., Ritter, B., de Heuvel, E., Baranes, D., Plomann, M., and McPherson, P. S. (2001) The Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor mammalian Son-of-sevenless interacts with PACSIN 1/syndapin I, a regulator of endocytosis and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* **276**, 26622-26628
182. Rao, Y., Ma, Q., Vahedi-Faridi, A., Sundborger, A., Pechstein, A., Puchkov, D., Luo, L., Shupliakov, O., Saenger, W., and Haucke, V. (2010) Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 8213-8218
183. Koch, D., Spiwoks-Becker, I., Sabanov, V., Sinning, A., Dugladze, T., Stellmacher, A., Ahuja, R., Grimm, J., Schuler, S., Muller, A., Angenstein, F., Ahmed, T., Diesler, A., Moser, M., Tom Dieck, S., Spessert, R., Boeckers, T. M., Fassler, R., Hubner, C. A., Balschun, D., Gloveli, T., Kessels, M. M., and Qualmann, B. (2011) Proper synaptic vesicle formation and neuronal network activity critically rely on syndapin I. *The EMBO journal* **30**, 4955-4969
184. Modregger, J., DiProspero, N. A., Charles, V., Tagle, D. A., and Plomann, M. (2002) PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Genet* **11**, 2547-2558
185. de Kreuk, B. J., Anthony, E. C., Geerts, D., and Hordijk, P. L. (2012) The F-BAR protein PACSIN2 regulates epidermal growth factor receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* **287**, 43438-43453

186. Senju, Y., Itoh, Y., Takano, K., Hamada, S., and Suetsugu, S. (2011) Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *Journal of cell science* **124**, 2032-2040
187. Wang, Q., Navarro, M. V., Peng, G., Molinelli, E., Goh, S. L., Judson, B. L., Rajashankar, K. R., and Sonderrmann, H. (2009) Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 12700-12705
188. Hansen, C. G., Howard, G., and Nichols, B. J. (2011) Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *Journal of cell science* **124**, 2777-2785
189. Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., and et al. (1994) Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Molecular and cellular biology* **14**, 2777-2785
190. Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**, 431-442
191. Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997) A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* **89**, 693-702
192. Li, S., Couvillon, A. D., Brasher, B. B., and Van Etten, R. A. (2001) Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *The EMBO journal* **20**, 6793-6804
193. Okutani, T., Okabayashi, Y., Kido, Y., Sugimoto, Y., Sakaguchi, K., Matuoka, K., Takenawa, T., and Kasuga, M. (1994) Grb2/Ash binds directly to tyrosines 1068 and 1086 and indirectly to tyrosine 1148 of activated human epidermal growth factor receptors in intact cells. *The Journal of biological chemistry* **269**, 31310-31314
194. Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P. G., Schlessinger, J., Pawson, T., and et al. (1992) Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* **360**, 689-692
195. Schlaepfer, D. D., Jones, K. C., and Hunter, T. (1998) Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Molecular and cellular biology* **18**, 2571-2585
196. Anggono, V., and Robinson, P. J. (2007) Syndapin I and endophilin I bind overlapping proline-rich regions of dynamin I: role in synaptic vesicle endocytosis. *Journal of neurochemistry* **102**, 931-943
197. Meisner, H., Conway, B. R., Hartley, D., and Czech, M. P. (1995) Interactions of Cbl with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase in activated Jurkat cells. *Molecular and cellular biology* **15**, 3571-3578
198. She, H. Y., Rockow, S., Tang, J., Nishimura, R., Skolnik, E. Y., Chen, M., Margolis, B., and Li, W. (1997) Wiskott-Aldrich syndrome protein is associated with the adapter protein Grb2 and the epidermal growth factor receptor in living cells. *Molecular biology of the cell* **8**, 1709-1721

199. McDonald, C. B., Seldeen, K. L., Deegan, B. J., and Farooq, A. (2009) SH3 domains of Grb2 adaptor bind to PXpsiPXR motifs within the Sos1 nucleotide exchange factor in a discriminate manner. *Biochemistry* **48**, 4074-4085
200. Egan, S. E., Giddings, B. W., Brooks, M. W., Buday, L., Sizeland, A. M., and Weinberg, R. A. (1993) Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* **363**, 45-51
201. Holgado-Madruga, M., Emlet, D. R., Moscatello, D. K., Godwin, A. K., and Wong, A. J. (1996) A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* **379**, 560-564
202. Schaeper, U., Gehring, N. H., Fuchs, K. P., Sachs, M., Kempkes, B., and Birchmeier, W. (2000) Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol* **149**, 1419-1432
203. Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Haglund, K., Kowanetz, M., Husnjak, K., Taylor, J. D., Soubeyran, P., Engstrom, U., Ladbury, J. E., and Dikic, I. (2003) Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *The Journal of biological chemistry* **278**, 39735-39746
204. Solomaha, E., Szeto, F. L., Yousef, M. A., and Palfrey, H. C. (2005) Kinetics of Src homology 3 domain association with the proline-rich domain of dynamins: specificity, occlusion, and the effects of phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 23147-23156
205. Kingston, R. E., Chen, C. A., and Rose, J. K. (2003) Calcium phosphate transfection. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* **Chapter 9**, Unit 9 1
206. Mouchantaf, R., Azakir, B. A., McPherson, P. S., Millard, S. M., Wood, S. A., and Angers, A. (2006) The ubiquitin ligase itch is auto-ubiquitylated in vivo and in vitro but is protected from degradation by interacting with the deubiquitylating enzyme FAM/USP9X. *The Journal of biological chemistry* **281**, 38738-38747
207. Ward, C. L., Omura, S., and Kopito, R. R. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**, 121-127
208. Kroeger, K. M., and Eidne, K. A. (2004) Study of G-protein-coupled receptor-protein interactions by bioluminescence resonance energy transfer. *Methods in molecular biology* **259**, 323-333
209. Mund, T., and Pelham, H. R. (2009) Control of the activity of WW-HECT domain E3 ubiquitin ligases by NDFIP proteins. *EMBO reports* **10**, 501-507
210. Azakir, B. A., Desrochers, G., and Angers, A. (2010) The ubiquitin ligase Itch mediates the antiapoptotic activity of epidermal growth factor by promoting the ubiquitylation and degradation of the truncated C-terminal portion of Bid. *The FEBS journal* **277**, 1319-1330
211. Courbard, J. R., Fiore, F., Adelaide, J., Borg, J. P., Birnbaum, D., and Ollendorff, V. (2002) Interaction between two ubiquitin-protein isopeptide ligases of different classes, CBLC and AIP4/ITCH. *The Journal of biological chemistry* **277**, 45267-45275
212. Yang, C., Zhou, W., Jeon, M. S., Demydenko, D., Harada, Y., Zhou, H., and Liu, Y. C. (2006) Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Molecular cell* **21**, 135-141

213. Pechstein, A., Gerth, F., Milosevic, I., Japel, M., Eichhorn-Grunig, M., Vorontsova, O., Bacetic, J., Maritzen, T., Shupliakov, O., Freund, C., and Haucke, V. (2015) Vesicle uncoating regulated by SH3-SH3 domain-mediated complex formation between endophilin and intersectin at synapses. *EMBO reports* **16**, 232-239
214. Kintscher, C., Wuertenberger, S., Eysenstein, R., Uhlendorf, T., and Groemping, Y. (2010) Autoinhibition of GEF activity in Intersectin 1 is mediated by the short SH3-DH domain linker. *Protein science : a publication of the Protein Society* **19**, 2164-2174
215. Zamanian, J. L., and Kelly, R. B. (2003) Intersectin 1L guanine nucleotide exchange activity is regulated by adjacent src homology 3 domains that are also involved in endocytosis. *Molecular biology of the cell* **14**, 1624-1637
216. Berry, D. M., Nash, P., Liu, S. K., Pawson, T., and McGlade, C. J. (2002) A high-affinity Arg-X-X-Lys SH3 binding motif confers specificity for the interaction between Gads and SLP-76 in T cell signaling. *Current biology : CB* **12**, 1336-1341
217. Dutta, S., and Rittinger, K. (2010) Regulation of NOXO1 activity through reversible interactions with p22 and NOXA1. *PloS one* **5**, e10478
218. Ghose, R., Shekhtman, A., Goger, M. J., Ji, H., and Cowburn, D. (2001) A novel, specific interaction involving the Csk SH3 domain and its natural ligand. *Nature structural biology* **8**, 998-1004
219. Harkiolaki, M., Lewitzky, M., Gilbert, R. J., Jones, E. Y., Bourette, R. P., Mouchiroud, G., Sondermann, H., Moarefi, I., and Feller, S. M. (2003) Structural basis for SH3 domain-mediated high-affinity binding between Mona/Gads and SLP-76. *The EMBO journal* **22**, 2571-2582
220. Kami, K., Takeya, R., Sumimoto, H., and Kohda, D. (2002) Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. *The EMBO journal* **21**, 4268-4276
221. Lapouge, K., Smith, S. J., Groemping, Y., and Rittinger, K. (2002) Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *The Journal of biological chemistry* **277**, 10121-10128
222. Lee, C. H., Leung, B., Lemmon, M. A., Zheng, J., Cowburn, D., Kuriyan, J., and Saksela, K. (1995) A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *The EMBO journal* **14**, 5006-5015
223. Hashimoto, S., Hirose, M., Hashimoto, A., Morishige, M., Yamada, A., Hosaka, H., Akagi, K., Ogawa, E., Oneyama, C., Agatsuma, T., Okada, M., Kobayashi, H., Wada, H., Nakano, H., Ikegami, T., Nakagawa, A., and Sabe, H. (2006) Targeting AMAP1 and cortactin binding bearing an atypical src homology 3/proline interface for prevention of breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7036-7041
224. Moncalian, G., Cardenes, N., Deribe, Y. L., Spinola-Amilibia, M., Dikic, I., and Bravo, J. (2006) Atypical polyproline recognition by the CMS N-terminal Src homology 3 domain. *The Journal of biological chemistry* **281**, 38845-38853
225. Micheva, K. D., Kay, B. K., and McPherson, P. S. (1997) Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *The Journal of biological chemistry* **272**, 27239-27245



226. Wuertenberger, S., and Groemping, Y. (2015) A single PXXP motif in the C-terminal region of srGAP3 mediates binding to multiple SH3 domains. *FEBS letters* **589**, 1156-1163
227. Desrochers, G., Lussier-Price, M., Omichinski, J. G., and Angers, A. (2015) Multiple Src homology 3 binding to the ubiquitin ligase Itch conserved proline-rich region. *Biochemistry* **54**, 7345-7354
228. Blott, E. J., Bossi, G., Clark, R., Zvelebil, M., and Griffiths, G. M. (2001) Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *Journal of cell science* **114**, 2405-2416
229. Craig, R., and Beavis, R. C. (2004) TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* **20**, 1466-1467
230. Fenyo, D., Eriksson, J., and Beavis, R. (2010) Mass spectrometric protein identification using the global proteome machine. *Methods in molecular biology* **673**, 189-202
231. London, N., Raveh, B., Cohen, E., Fathi, G., and Schueler-Furman, O. (2011) Rosetta FlexPepDock web server--high resolution modeling of peptide-protein interactions. *Nucleic Acids Res* **39**, W249-253
232. Raveh, B., London, N., and Schueler-Furman, O. (2010) Sub-angstrom modeling of complexes between flexible peptides and globular proteins. *Proteins* **78**, 2029-2040
233. Laskowski, R. A., and Swindells, M. B. (2011) LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model* **51**, 2778-2786
234. Wallace, A. C., Laskowski, R. A., and Thornton, J. M. (1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* **8**, 127-134
235. Bartelt, R. R., Light, J., Vacaflores, A., Butcher, A., Pandian, M., Nash, P., and Houtman, J. C. (2015) Regions outside of conserved PxxPxR motifs drive the high affinity interaction of GRB2 with SH3 domain ligands. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 2560-2569
236. Yamazaki, T., Zaal, K., Hailey, D., Presley, J., Lippincott-Schwartz, J., and Samelson, L. E. (2002) Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization. *Journal of cell science* **115**, 1791-1802
237. Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., and Kholodenko, B. N. (2012) Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans* **40**, 139-146
238. Luttrell, D. K., and Luttrell, L. M. (2004) Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene* **23**, 7969-7978
239. van Biesen, T., Hawes, B. E., Luttrell, D. K., Krueger, K. M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (1995) Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* **376**, 781-784
240. Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A., and Sorkin, A. (2003) Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Molecular biology of the cell* **14**, 858-870
241. Li, N., Lorinczi, M., Ireton, K., and Elferink, L. A. (2007) Specific Grb2-mediated interactions regulate clathrin-dependent endocytosis of the cMet-tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry* **282**, 16764-16775

242. Ahmed, Z., Timsah, Z., Suen, K. M., Cook, N. P., Lee, G. R. t., Lin, C. C., Gagea, M., Marti, A. A., and Ladbury, J. E. (2015) Grb2 monomer-dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function. *Nat Commun* **6**, 7354
243. Lin, C. C., Melo, F. A., Ghosh, R., Suen, K. M., Stagg, L. J., Kirkpatrick, J., Arold, S. T., Ahmed, Z., and Ladbury, J. E. (2012) Inhibition of basal FGF receptor signaling by dimeric Grb2. *Cell* **149**, 1514-1524
244. Qu, Y., Chen, Q., Lai, X., Zhu, C., Chen, C., Zhao, X., Deng, R., Xu, M., Yuan, H., Wang, Y., Yu, J., and Huang, J. (2014) SUMOylation of Grb2 enhances the ERK activity by increasing its binding with Sos1. *Mol Cancer* **13**, 95
245. Chatel-Chaix, L., Abrahamyan, L., Frechina, C., Mouland, A. J., and DesGroseillers, L. (2007) The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *J Virol* **81**, 6216-6230
246. Maignan, S., Guilloteau, J. P., Fromage, N., Arnoux, B., Becquart, J., and Ducruix, A. (1995) Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science* **268**, 291-293
247. McPherson, P. S., Czernik, A. J., Chilcote, T. J., Onofri, F., Benfenati, F., Greengard, P., Schlessinger, J., and De Camilli, P. (1994) Interaction of Grb2 via its Src homology 3 domains with synaptic proteins including synapsin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 6486-6490
248. Haglund, K., and Dikic, I. (2012) The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *Journal of cell science* **125**, 265-275
249. Lewitzky, M., Kardinal, C., Gehring, N. H., Schmidt, E. K., Konkol, B., Eulitz, M., Birchmeier, W., Schaeper, U., and Feller, S. M. (2001) The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-x-x-P core motif. *Oncogene* **20**, 1052-1062
250. McDonald, C. B., Balke, J. E., Bhat, V., Mikles, D. C., Deegan, B. J., Seldeen, K. L., and Farooq, A. (2012) Multivalent binding and facilitated diffusion account for the formation of the Grb2-Sos1 signaling complex in a cooperative manner. *Biochemistry* **51**, 2122-2135
251. Gu, Q., Bowden, G. T., Normolle, D., and Sun, Y. (2007) SAG/ROC2 E3 ligase regulates skin carcinogenesis by stage-dependent targeting of c-Jun/AP1 and I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B. *J Cell Biol* **178**, 1009-1023
252. Migliorini, D., Bogaerts, S., Defever, D., Vyas, R., Denecker, G., Radaelli, E., Zwolinska, A., Depaepe, V., Hochepped, T., Skarnes, W. C., and Marine, J. C. (2011) Cop1 constitutively regulates c-Jun protein stability and functions as a tumor suppressor in mice. *J Clin Invest* **121**, 1329-1343
253. Nateri, A. S., Riera-Sans, L., Da Costa, C., and Behrens, A. (2004) The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science* **303**, 1374-1378
254. Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhang, Z., Dornan, D., Arnott, D., Deshaies, R. J., and Dixit, V. M. (2004) Human De-etiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. *Science* **303**, 1371-1374
255. Xia, Y., Wang, J., Xu, S., Johnson, G. L., Hunter, T., and Lu, Z. (2007) MEKK1 mediates the ubiquitination and degradation of c-Jun in response to osmotic stress. *Molecular and cellular biology* **27**, 510-517

256. Sanjay, A., Miyazaki, T., Itzstein, C., Purev, E., Horne, W. C., and Baron, R. (2006) Identification and functional characterization of an Src homology 3 domain-binding site on Cbl. *The FEBS journal* **273**, 5442-5456
257. Sparks, A. B., Rider, J. E., Hoffman, N. G., Fowlkes, D. M., Quillam, L. A., and Kay, B. K. (1996) Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 1540-1544
258. McDonald, C. B., Seldeen, K. L., Deegan, B. J., Lewis, M. S., and Farooq, A. (2008) Grb2 adaptor undergoes conformational change upon dimerization. *Arch Biochem Biophys* **475**, 25-35
259. Venuprasad, K., Huang, H., Harada, Y., Elly, C., Subramaniam, M., Spelsberg, T., Su, J., and Liu, Y. C. (2008) The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1. *Nat Immunol* **9**, 245-253
260. Huang, H., Jeon, M. S., Liao, L., Yang, C., Elly, C., Yates, J. R., 3rd, and Liu, Y. C. (2010) K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity* **33**, 60-70
261. Xu, X. X., Yi, T., Tang, B., and Lambeth, J. D. (1998) Disabled-2 (Dab2) is an SH3 domain-binding partner of Grb2. *Oncogene* **16**, 1561-1569
262. Boateng, L. R., Cortesio, C. L., and Huttenlocher, A. (2012) Src-mediated phosphorylation of mammalian Abp1 (DBNL) regulates podosome rosette formation in transformed fibroblasts. *Journal of cell science* **125**, 1329-1341
263. Grunewald, T. G., and Butt, E. (2008) The LIM and SH3 domain protein family: structural proteins or signal transducers or both? *Mol Cancer* **7**, 31
264. Lua, B. L., and Low, B. C. (2005) Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control. *FEBS letters* **579**, 577-585
265. Lynch, D. K., Winata, S. C., Lyons, R. J., Hughes, W. E., Lehrbach, G. M., Wasinger, V., Corthals, G., Cordwell, S., and Daly, R. J. (2003) A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* **278**, 21805-21813
266. Zhang, R., Zhang, C., Zhao, Q., and Li, D. (2013) Spectrin: structure, function and disease. *Sci China Life Sci* **56**, 1076-1085
267. Gushchina, L. V., Gabdulkhakov, A. G., Nikonov, S. V., and Filimonov, V. V. (2011) High-resolution crystal structure of spectrin SH3 domain fused with a proline-rich peptide. *J Biomol Struct Dyn* **29**, 485-495